ORSAY
No. 1492

THESE

présentée

A L'UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES PHYSIQUES

par

LETOURNEUX Yves

Synthèses et activités biologiques de dérivés en 20 et 22 du cholestérol

Soutenue le 30 mai 1975 devant la Commission d'examen

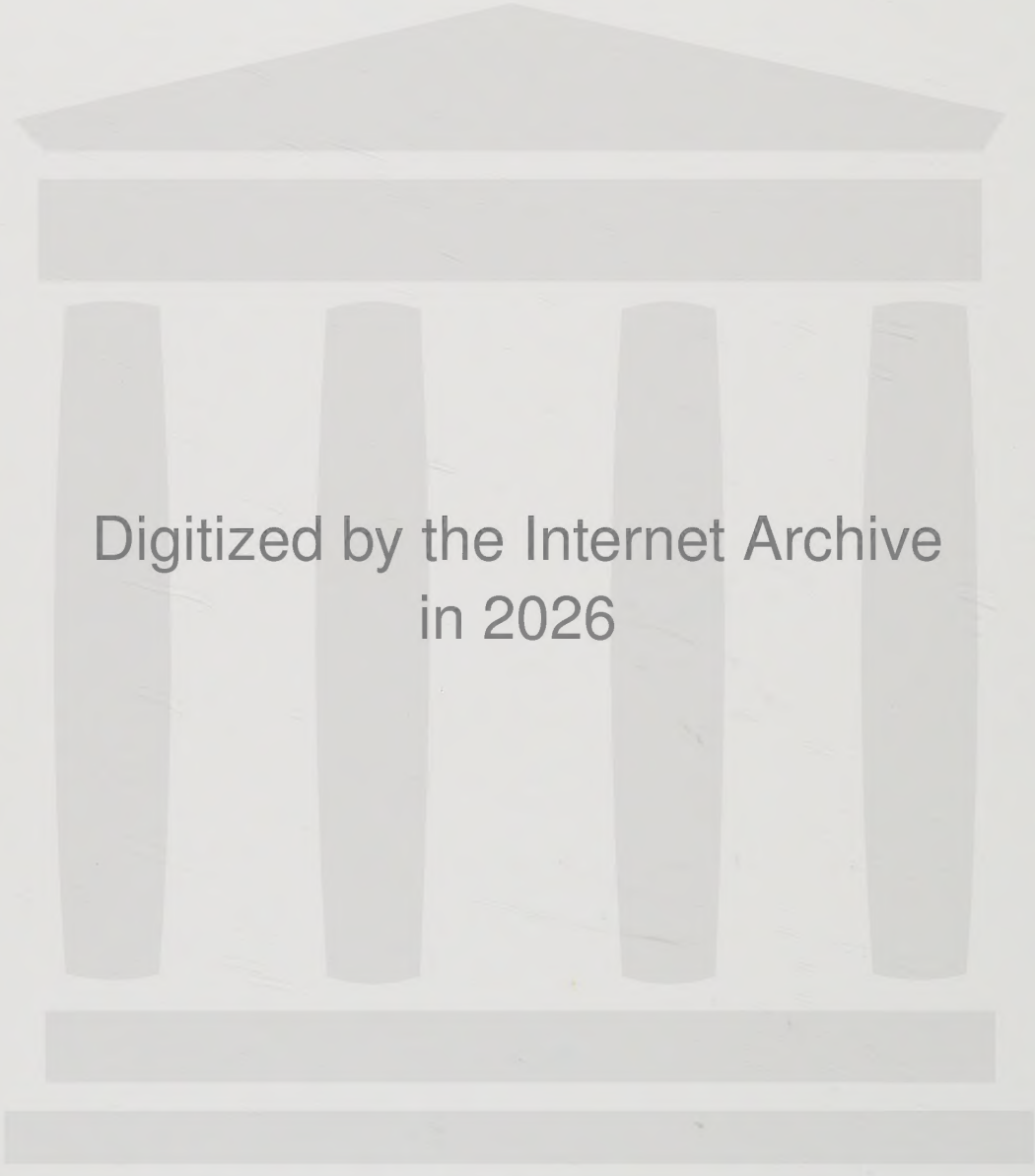
MM FETIZON Président

BARBIER

DAS Examinateurs

DESGREZ

LUKACS


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548121_0034

ORSAY
No. 1492

THESE

présentée

A L'UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES PHYSIQUES

par

LETOURNEUX Yves

Synthèses et activités biologiques de dérivés en 20 et 22 du cholestérol

Soutenue le 30 mai 1975 devant la Commission d'examen

MM FETIZON Président

BARBIER

DAS Examinateurs

DESGREZ

LUKACS

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A MONSIEUR MARCEL FETIZON
Professeur à la Faculté des Sciences d'Orsay,

qui a bien voulu me faire l'honneur
de présider le jury de cette thèse

A MONSIEUR PIERRE DESGREZ
Professeur au Centre Hospitalier Universitaire de La Pitié Salpétrière

A MONSIEUR MICHEL BARBIER
Maître de Recherche au C.N.R.S.

A MONSIEUR BHUPESH C. DAS
Maître de Recherche au C.N.R.S.

A MONSIEUR GABOR LUKACS
Maître de Recherche au C.N.R.S.

qui ont accepté de juger de travail

En hommage de respectueuse gratitude

Je tiens à exprimer ici, ma profonde gratitude aux personnalités qui ont bien voulu m'apporter leur appui matériel, et m'aider de leurs conseils, lors de la réalisation de cette étude.

Je me dois de citer notamment :

MONSIEUR MARCEL GUT

Principal Scientist à la Worcester Foundation for Experimental Biology (Massachusetts),

qui m'a confié le sujet de cette thèse, et m'a fait l'honneur de m'accueillir dans son laboratoire. Je ne saurais oublierl'ambiance de chaude amitié dont il a su m'entourer, lors de mon séjour aux Etats-Unis.

MONSIEUR MAURICE-MARIE JANOT

Membre de l'Institut,
Membre de l'Académie Nationale de Médecine,
Directeur de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles,
Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris,

qui m'a accueilli dans ses laboratoires, où j'ai pu entreprendre la première phase de mes travaux.

MONSIEUR PIERRE DESGREZ
Professeur au Centre Hospitalier Universitaire de La Pitié Salpétrière

qui m'a apporté la base matérielle indispensable en m'attribuant le poste d'Attaché-Assistant dans ses services. Je lui suis profondément reconnaissant de la confiance paternelle qu'il m'a toujours manifestée.

MONSIEUR ROBERT GOUTAREL
Directeur au Centre National de la Recherche Scientifique

qui m'a fait bénéficier de sa grande expérience et de sa haute compétence.

MONSIEUR PIERRE POTIER
Directeur de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles

pour son accueil bienveillant et l'intérêt qu'il a porté à ce travail.

MONSIEUR QUI KHUONG-HUU
Maître de Recherche au C. N. R. S.

qui m'a prodigué ses conseils dans la première phase de mes travaux

MONSIEUR GABOR LUKACS
Maître de Recherche au C. N. R. S.

qui m'a fait bénéficier de sa grande compétence pour l'interprétation des spectres de ^{13}C.

Je remercie très vivement,

MESSIEURS BARDEY, BERANGER, COSSON & SEPTE, des services de RMN et de Masse (ICSN), ainsi que W. ANDERSON & N. DAVIS (WFEB),

dont l'aimable et active collaboration a été indispensable à la bonne exécution de cette thèse.

Je remercie également mes camarades de laboratoire,

MESSIEURS B. DELPECH, J. EINHORN, I. KABORE, A. PANCRAZI, J.M. TEKAM,

pour leur soutien moral et leurs discussions constructives pendant la réalisation de ce travail.

Enfin, je ne saurais terminer sans remercier,

MONSIEUR SCHLOMO BURSTEIN, Houston (Texas),

Les AYERST RESEARCH LABORATORIES, Montréal (Canada), et spécialement MONSIEUR M.N. CAYEN,

Le WISTAR INSTITUTE OF ANATOMY AND BIOLOGY, Philadelphia (Pennsylvania), et tout spécialement MONSIEUR DAVID KRITCHEVSKY,

pour l'intérêt et la collaboration apportés dans la réalisation de cette étude.

A CHANTAL

A MES PARENTS

A YANNOU

A MA FAMILLE

A MES AMIS

S O M M A I R E

AVANT-PROPOS

PARTIE THEORIQUE

INTRODUCTION

Rappel du métabolisme du cholestérol -19-
Transformation du cholestérol en prégnénolone -21-

BUT ET PLAN DE L'ETUDE

CHAPITRE I

SYNTHESE DE DERIVES AZOTES EN 22 DU CHOLESTEROL

A/ SYNTHESE STEREOSPECIFIQUE DES AMINO-22 CHOLESTEROL -30-

1° Réduction du céto-22 cholestérol
2° Azidolyse du tosyloxy (22R) et (22S) cholestérol
3° Réduction des azido-22 cholestérol
4° Synthèse stéréospécifique de l'amino-(22R) cholestérol

B/ SYNTHESE DES AMINO-22 CHOLESTEROL A PARTIR DE L'OXIMO-22 CHOLESTEROL -37-

1° Obtention de l'oxymo-22 cholestérol 18 et de l'hydrazone du céto-22 cholestérol 19
2° Réduction de l'oximo-22 cholestérol 18

C/ DETERMINATION DE LA CONFIGURATION ABSOLUE DES SUBSTITUANTS EN C-22 PAR RMN DU ^{13}C -41-

CHAPITRE II SYNTHESE DU METHYL-20 CHOLESTEROL

METHYLATION DE L'HYDROXY-3β CHOLESTADIENE-5,20 (22) ONE-23 -49-

A/ SYNTHESE DE L'ACETOXY-3β NOR-24 CHOLADIENE-5,20 (22) AL-23 -49-

1° Réarrangement acido-catalysé du (20S) acétoxy-3β vinyl-20 prégnène-5 ol-20
2° Oxydation du dihydroxy-3β , 23 nor 24 choladiène-5,20 (22) 25

B/ SYNTHESE DE L'HYDROXY-3β CHOLESTADIENE-5,20 (22) ONE-23 31a -58-

C/ METHYLATION DE LA CETONE CONJUGUEE 31b -59-

METHYL-20 CHOLESTEROL PAR C-METHYLATION DU METHOXY-6β CYCLO-3α , 5α BISNOR-23,24 CHOLANAL-22 -61-

METHYL-20 CHOLESTEROL PAR C-METHYLATION AVEC ENOLISATION REGIOSPECIFIQUE DU TETRAHYDROPYRANNYLOXY-(20R) CETO-22 CHOLESTEROL -67-

1° Synthèse de 44
2° Alkylation de 44
3° Obtention du méthyl-20 cholestérol 39

CHAPITRE III TESTS BIOLOGIQUES

I EXPERIENCES IN VITRO -81-

A/ BIOSYNTHESE DU CHOLESTEROL
B/ BIODEGRADATION DU CHOLESTEROL DANS LES SURRENALES -84-

II EXPERIENCES IN VIVO -85-

PARTIE EXPERIMENTALE

Synthèse de dérivés azotés en 22 du cholestérol -91-

Méthylation de l'hydroxy-3βcholestadiène-5,20 (22) one-23 -105-

Méthyl-20 cholestérol par C-méthylation du méthoxy-6β cyclo-3α, 5α bisnor-23,24 cholanal-22 -117-

Méthyl-20 cholestérol par C-méthylation avec énolisation régio-spécifique du tétrahydropyrannyloxy-(20R) céto-22 cholestérol -121-

Tests biologiques -129-

CONCLUSION -135-

BIBLIOGRAPHIE -139-

AVANT-PROPOS

Ces dernières années, une si large publicité a été faite sur les méfaits du Cholestérol, que son rôle a été exagérément noirci.

On a tendance à ne voir en lui qu'une substance chimique contribuant à épaissir la paroi des artères, où elle se dépose en quantité importante. N'a-t-on pas été jusqu'à l'accuser d'être cancérigène !

De façon générale, on a observé que l'athérosclérose se caractérise par une augmentation importante, dans la paroi artérielle, des lipides totaux, du cholestérol total, des sphingomyélines et un abaissement des triglycérides et des phospholipides.

Cholestérol et athérosclérose sont habituellement considérés comme synonymes car le taux de cholestérol est généralement élevé lorsque cette affection se manifeste. On en déduit abusivement qu'il existe une relation systématique de cause à effet entre ces deux phénomènes. Sans aller jusqu'à cette interprétation extrême, il n'en reste pas moins qu'un lien existe certainement entre eux, et on est conduit à supposer qu'en diminuant la cholestérolémie, on pourrait éviter le développement des phénomènes athéroscléreux et même faire régresser les lésions aortiques.

Les recherches sur les hypocholestérolémiants se sont dirigées vers les possibilités suivantes :

- freiner la biosynthèse du cholestérol ;
- diminuer l'apport du cholestérol exogène et des graisses qui facilitent son absorption ;
- diminuer l'absorption intestinale du cholestérol ;
- accroître l'excrétion biliaire du cholestérol ;
- augmenter la vitesse de conversion du cholestérol en acides biliaires.

En fait, le mécanisme régissant le métabolisme du cholestérol dans l'organisme, les rapports qui lient cholestérol et athérome, sont imparfaitement élucidés.

On a montré que la diminution de l'apport alimentaire de cholestérol est compensé par une synthèse accrue dans l'organisme.

D'autre part, il se peut que la chute du taux de cholestérol se fasse au prix d'un dépôt accru dans les tissus, allant ainsi à l'encontre du but recherché.

Cependant, il ne faut pas ignorer que le cholestérol existe dans toutes les cellules animales, et qu'il est indispensable dans son rôle de :

- transporteur des graisses hépatiques et sanguines,
- maintien de l'architecture cellulaire,
- précurseur des hormones stéroïdiques et des acides biliaires,
- antitoxique, en donnant, avec les substances hémolysantes, des complexes inactifs.

PARTIE THEORIQUE

INTRODUCTION

RAPPEL DU METABOLISME DU CHOLESTEROL

Le mécanisme de la biosynthèse du cholestérol, situé principalement dans le foie, a été presque complètement élucidé à l'aide de précurseurs marqués (BLOCK, LINEN et CORNFORTH).

Il n'entre pas dans le cadre de cet exposé de décrire en détail le métabolisme du cholestérol. Rappelons toutefois, que les premières réactions, responsables de la transformation de l'acétyl CoA en acétoacétyl-ACP, sont catalysées par les enzymes de la voie extramitochondriale de synthèse des acides gras.

L'acétoacétyl-ACP est un métabolite commun qui peut conduire, soit à la synthèse des acides gras, soit à la synthèse du cholestérol.

C'est dans le foie que se trouve la voie principale de biodégradation du cholestérol.

En effet, l'aspect quantitatif de la conversion du cholestérol en acides biliaires a été déterminé dès 1950, par BERGSTROM et CHAIKOFF, à partir de cholestérol marqué.

Il a été montré que la première étape, la plus lente, conduit, dans les microsomes, à la formation d'hydroxy-7α cholestérol[1]

Les étapes suivantes procèdent aussi par hydroxylation, réduction de la liaison insaturée 5-6 et raccourcissement par oxydation de la chaîne latérale dans les mitochondries, avec formation d'une fonction acide, rendant celle-là hydrophile.[2]

La nature stéroïdique des hormones produites dans les ovaires, les testicules et les surrénales, suggéra rapidement la possibilité de leur provenance d'une substance commune. Il a été démontré que cette substance, la prégnénolone, est le seul précurseur des androgènes, des oestrogènes et des adrénocorticoïdes.[3]

Ainsi, un effort très important a été fait, depuis les vingt dernières années, pour déterminer les voies métaboliques de biosynthèse de ce composé

Transformation du cholestérol en prégnénolone

Il a été montré que[4-5] le cholestérol subit une coupure enzymatique entre C_{20} et C_{22} pour former la prégnénolone et un fragment oxygéné, comportant six carbones.

Selon les conditions d'incubation, le fragment en C_6 peut être isolé comme acide isocaproïque, aldéhyde isocaproïque, ou isohexanol[6-7]

Le schéma admis pour cette conversion consiste en une oxydation en C-20 et C-22, par des hydroxylations successives, suivies d'une coupure du glycol pour donner la prégnénolone.

De nombreuses expériences[8-9] effectuées principalement par M. GUT et S. BURSTEIN, ont montré que les intermédiaires suivants :

- hydroxy-(20S) cholestérol,
- hydroxy-(22R) cholestérol,
- dihydroxy-(20R, 22R) cholestérol,

étaient transformés en prégnénolone, plus rapidement que le cholestérol lui-même ainsi qu'il apparaît dans le tableau suivant :

Substrat	Prégnénolone %
Cholestérol.....	7
Hydroxy-(20S) cholestérol.....	30
Hydroxy-(22R) cholestérol.....	91
Hydroxy-(22S) cholestérol.....	4
Hydroxy-(20R, 22R) cholestérol.....	87
Dihydroxy-(20R, 22S) cholestérol.....	57

Deux séquences métaboliques possibles, se présentent :

A : cholestérol ⟶ hydroxy-(20S) cholestérol ⟶ dihydroxy-(20R, 22R) cholestérol ⟶ prégnénolone ;

B : cholestérol ⟶ hydroxy-(22R) cholestérol ⟶ dihydroxy-(20R, 22R) cholestérol ⟶ prégnénolone.

La séquence A a été la plus souvent proposée, mais les études de KORITZ et HALL[10-11] et de SIMPSON et BOYD[12], ont apporté quelques doutes sur la validité de ce mécanisme, car il leur fut impossible d'isoler "in vitro", l'hydroxy-(20S) cholestérol.

HALL et KORITZ proposèrent l'existence de complexes enzymatiques, permettant le transfert du substrat directement d'un enzyme à un autre, sans libération de celui-ci dans le milieu.

Cependant, aucune preuve expérimentale directe n'avait pu être apportée sur l'existence de ces complexes.

Avec des préparations de mitochondries du cortex surrénal, à faible concentration de substrat, on observe des cinétiques de premier ordre.

Il a été possible de comparer quantitativement la formation de prégnénolone selon la séquence A, et selon la séquence B[13]

Ces études ont révélé que le cholestérol se transforme en prégnénolone dans une proportion nettement plus élevée selon la séquence B, que selon la séquence A.

Toutefois, si l'on considère ces séquences comme des réactions consécutives homogènes, on constate qu'elles ne représentent que 10 % du total de prégnénolone formée.

Pour expliquer les 90 % restant, il est possible d'envisager l'existence de voies métaboliques directes comme :

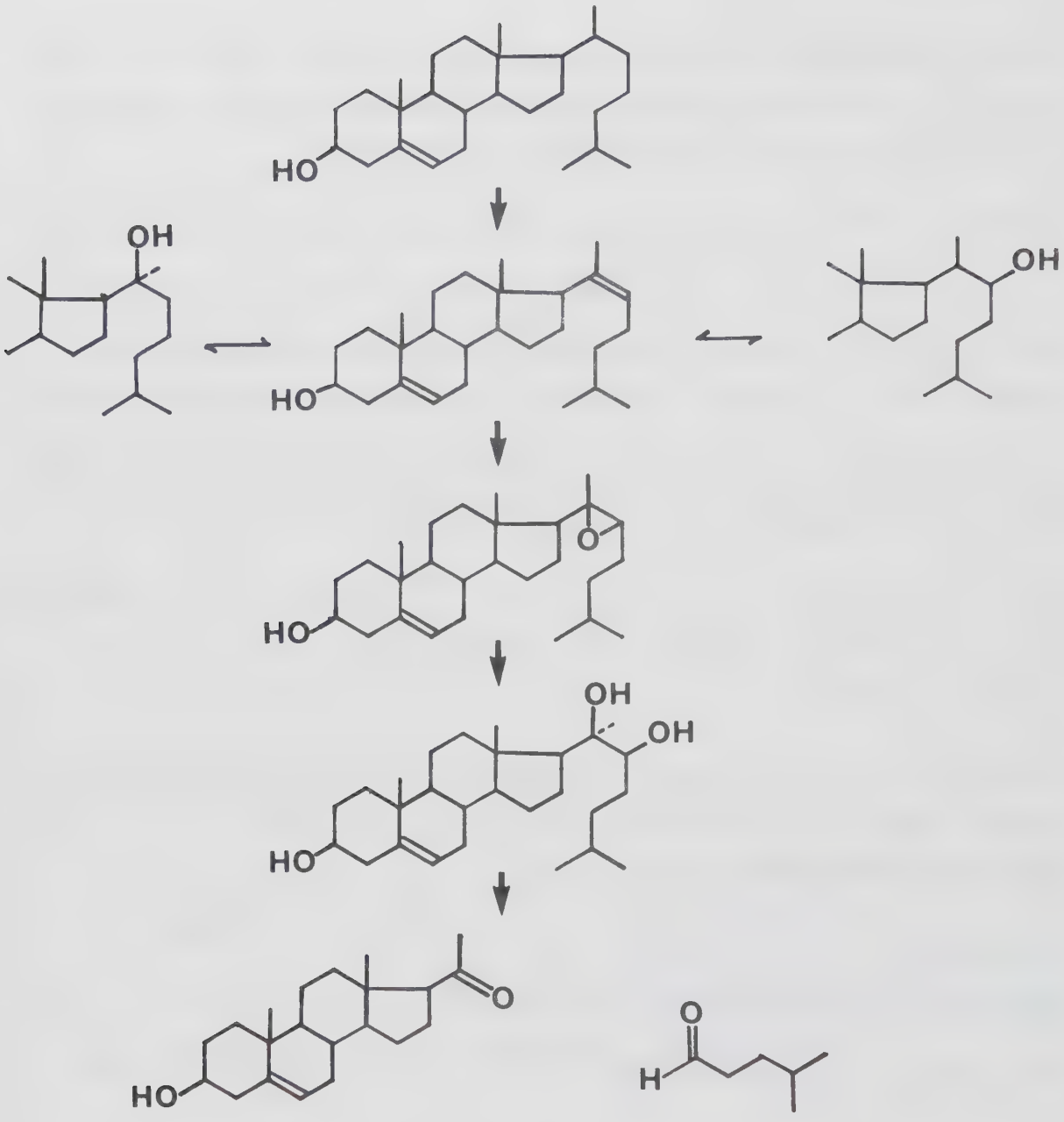
cholestérol ⟶ hydroxy-(20R, 22R) cholestérol ⟶ prégnénolone,

ou

cholestérol ⟶ hydroxy-(22R) cholestérol ⟶ prégnénolone ;

cependant, aucune preuve de leur existence n'a pu être apportée.

Ces résultats peuvent être expliqués également, par l'existence d'autres intermédiaires comme l'hydropéroxy-(20R) cholestérol, comme l'ont suggéré VAN LIER et SMITH[14]



R.J. KRAAIPOEL et al [15] expliquent ce mécanisme par deux intermédiaires supplémentaires : l'hydroxy-3 β cholestène-5,20 (22) et l'époxy-20,22 cholestérol.

LIEBERMAN[16] , de son côté, a proposé un mécanisme radicalaire.

Dans ce cas également, aucun des intermédiaires n'a pu être isolé.

M. GUT et S. BURSTEIN ont étudié récemment, la cinétique des produits hydroxylés, à l'aide d'un modèle expérimental différent[17]

En effet, dans les modes opératoires précédents, le départ de la réaction se faisait en additionnant en dernier soit le substrat, soit le système enzymatique, sans permettre l'équilibration enzyme : substrat. On obtenait alors des courbes cinétiques de premier ordre.

De nouvelles courbes cinétiques, par contre, ont été établies, en équilibrant préalablement les différents substrats avec le système enzymatique, puis en commençant la réaction par addition de NADPH.

Dans ces conditions, en opposition avec les conditions expérimentales précédentes, des cinétiques polyphasiques apparaîssent avec des vitesses initiales beaucoup plus élevées, indiquant l'existence d'un système compartimenté.

L'approche de l'enzyme par le substrat, ou plus précisément, la formation du complexe enzyme-substrat, apparaît bien plus lente que la transformation du cholestérol ou de ses dérivés hydroxylés en prégnénolone.

Les courbes cinétiques présentées montrent clairement qu'un intermédiaire B, par exemple, dans la séquence de réactions $A \longrightarrow B \longrightarrow C \longrightarrow D$, se transformera en C, à une vitesse beaucoup plus grande, quand il est déjà dans le compartiment enzymatique, que s'il est ajouté directement au milieu, sans équilibration préalable avec l'enzyme.

BUT ET PLAN DE L'ETUDE

Ainsi, malgré les différentes interprétations possibles du mécanisme de biodégradation du cholestérol en prégnénolone, il apparaît que la coupure de la liaison 20-22 passe par une modification préalable en C-20 et C-22.

Il nous a semblé intéressant de substituer les hydrogènes de ces carbones, par un groupement différent, dans le but d'étudier leur interférence dans le métabolisme du cholestérol.

Nous avons estimé que les orientations les plus prometteuses étaient :

- d'une part, la synthèse de dérivés azotés en 22,

- d'autre part, la synthèse d'un dérivé méthylé en 20.

Ces orientations n'ayant pas été prospectées jusqu'ici, nous avons en conséquence axé nos travaux dans cette direction, et la présente thèse expose les résultats obtenus.

Dans un premier chapitre, nous avons étudié la synthèse stéréospécifique des amino (22R) et (22S) cholestérol, et finalement de l'oximo-22 cholestérol qui conduit par réduction, au mélange de ces deux amines.

Dans un deuxième chapitre, nous décrivons la synthèse du méthyl-20 cholestérol selon trois voies différentes.

Et pour terminer, nous donnons les résultats des tests biologiques effectués avec ces produits.

CHAPITRE I

SYNTHESE DE DERIVES AZOTES en 22 du CHOLESTEROL[18]

Le présent chapitre traitera les points suivants :

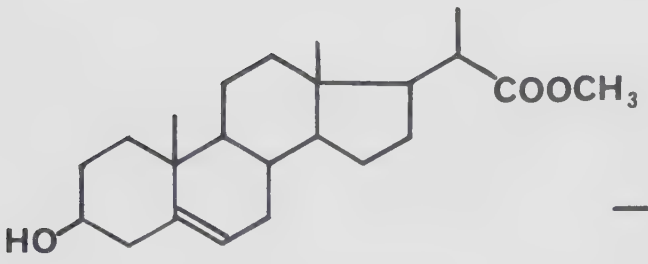
- synthèse stéréospécifique des amino-22 cholestérol, à partir des hydroxy-22 cholestérol ;

- synthèse des amino-22 cholestérol, par réduction de l'oximo-22 cholestérol ;

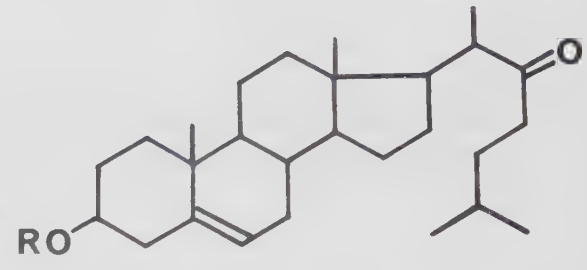
- détermination de la configuration absolue des substituants en C-22 par RMN du ^{13}C.

A/ SYNTHESE STEREOSPECIFIQUE DES AMINO-22 CHOLESTEROL

La synthèse stéréospécifique des amines (22R) et (22S), à partir des hydroxy-22 cholestérol [19] , a été réalisée par des réactions du type SN_2. A cet effet, les hydroxy-22 cholestérol ont été préparés.



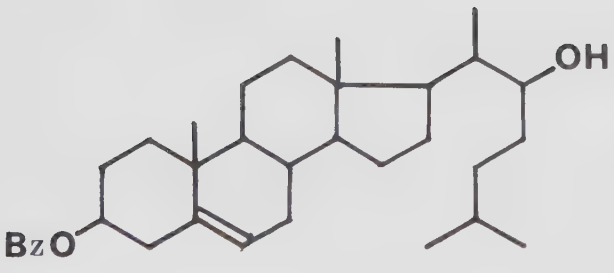
1



2 R = H

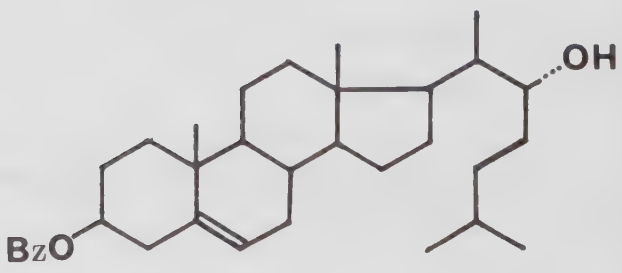
3 R = COC_6H_5

22S



4

22R



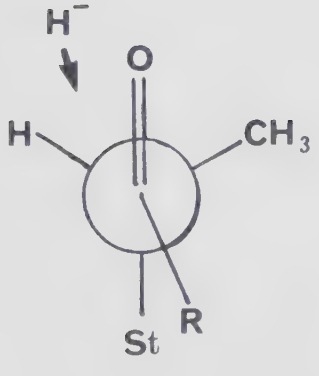
5

1° Réduction du céto-22 cholestérol

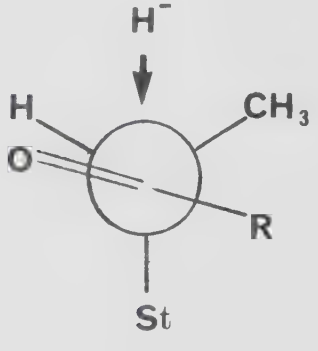
La réduction du benzoate-3β céto-22 cholestène-5 **3** par un large excès de BH_4Na, conduit au mélange d'alcools (22S) (75 %) **4** et (22R) (25 %) **5** , sans hydrogénolyse de la fonction ester.

Notons que la réduction de la cétone 22, par $LiAlH_4$ [20] , donne également en majorité (7 : 1) l'alcool (22S), ce qui est en contradiction avec la règle de CRAM, prévoyant l'alcool (22R).

La conformation éclipsée, nécessaire à l'application de la règle de CRAM, provoque sans doute une interéaction trop forte, entre la chaîne isopentylique et le cycle D du stéroïde.



conformation éclipsée
(selon CRAM)



conformation probable

Par réduction de cette cétone, avec un hydrure plus volumineux comme $LiAl(O\text{-}tBu)_3H$, nous avons obtenu uniquement l'alcool (22S) **15**.

Par contre, la réduction par un métal comme le lithium dans l'éthylamine, donne :

- 60 % d'hydroxy-(22R) cholestérol ;
- 40 % d'hydroxy-(22S) cholestérol.

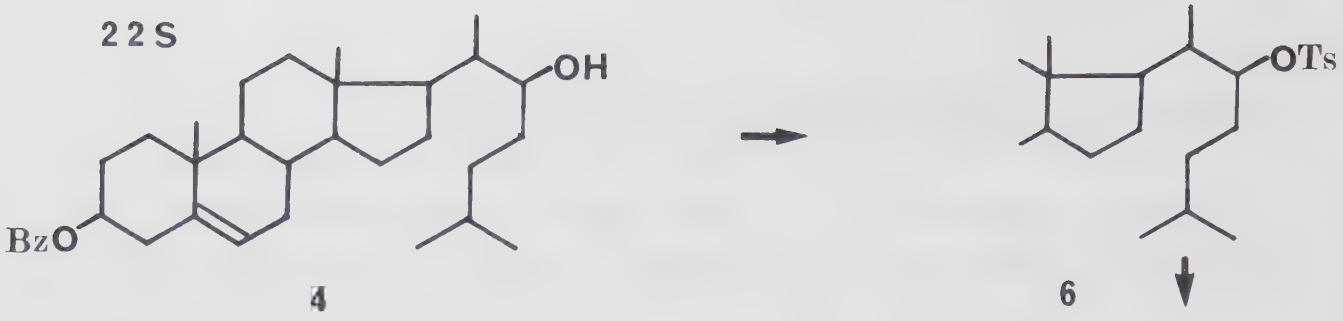
2° Azidolyse du tosyloxy (22R) et (22S) cholestérol

Les alcools épimères **4** et **5** sont séparés, par chromatographie, sur plaques préparatives de silicagel et cristallisations successives.

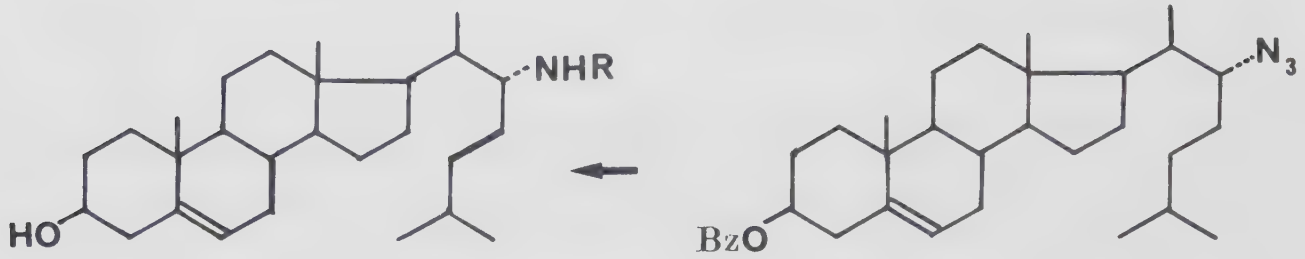
Ces alcools sont alors tosylés.

L'azidolyse du tosylate (22S) **4** dans un solvant polaire aprotique, l'HMPT, à la température du laboratoire, en présence d'azoture de sodium, conduit, avec inversion de configuration et quantitativement, à l'azide (22R) **8** .

Dans ces conditions opératoires, on n'observe pas la présence de produits d'élimination. Par contre, l'azidolyse du tosylate (22R) **7** , dans les mêmes conditions, conduit à un mélange d'azide (22S) **9** (85 %) et d'oléfine **9e** (15 %).



4 6

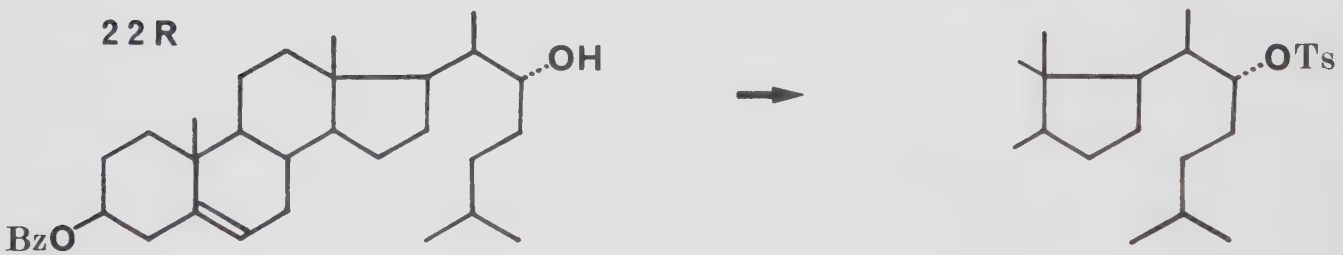


10 R = H

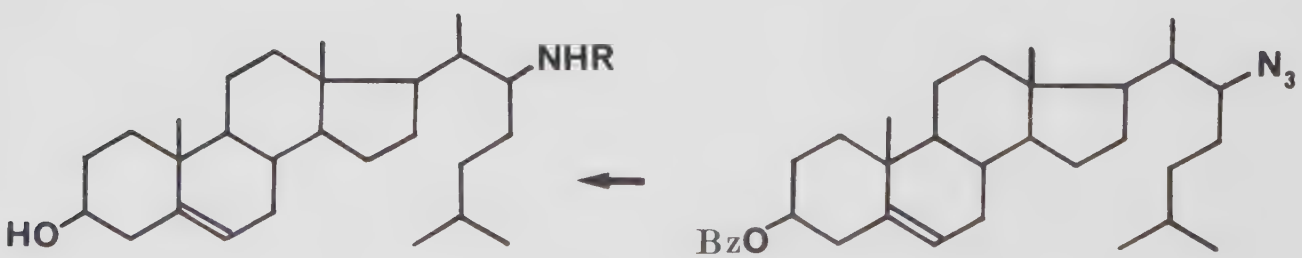
22R 10a R = $COCH_3$

10b R = COC_6H_5

8



5 7



11 R = H

22S 11a R = $COCH_3$

11b R = COC_6H_5

9

3° Réduction des azido-22 cholestérol

La réduction des azides **9** et **8** , par $AlLiH_4$, conduit respectivement aux amines (22S) **11** et (22R) **10** .

Ces amines donnent un spectre de masse caractéristique, comportant un pic m/e = 100, correspondant à la coupure de la chaîne latérale entre la liaison 20-22.

BARTON et al [20] ont constaté que les dérivés du cholestérol, possédant des substituants oxygénés en (22S), sont plus lévogyres que ceux correspondant à la série (22R).

Nous avons également constaté le même phénomène dans la série azotée en 22 : l'amine (22S), ainsi que ses dérivés, N-acétylé et N-benzoylé, étant plus lévogyres que leurs homologues de la série (22R).

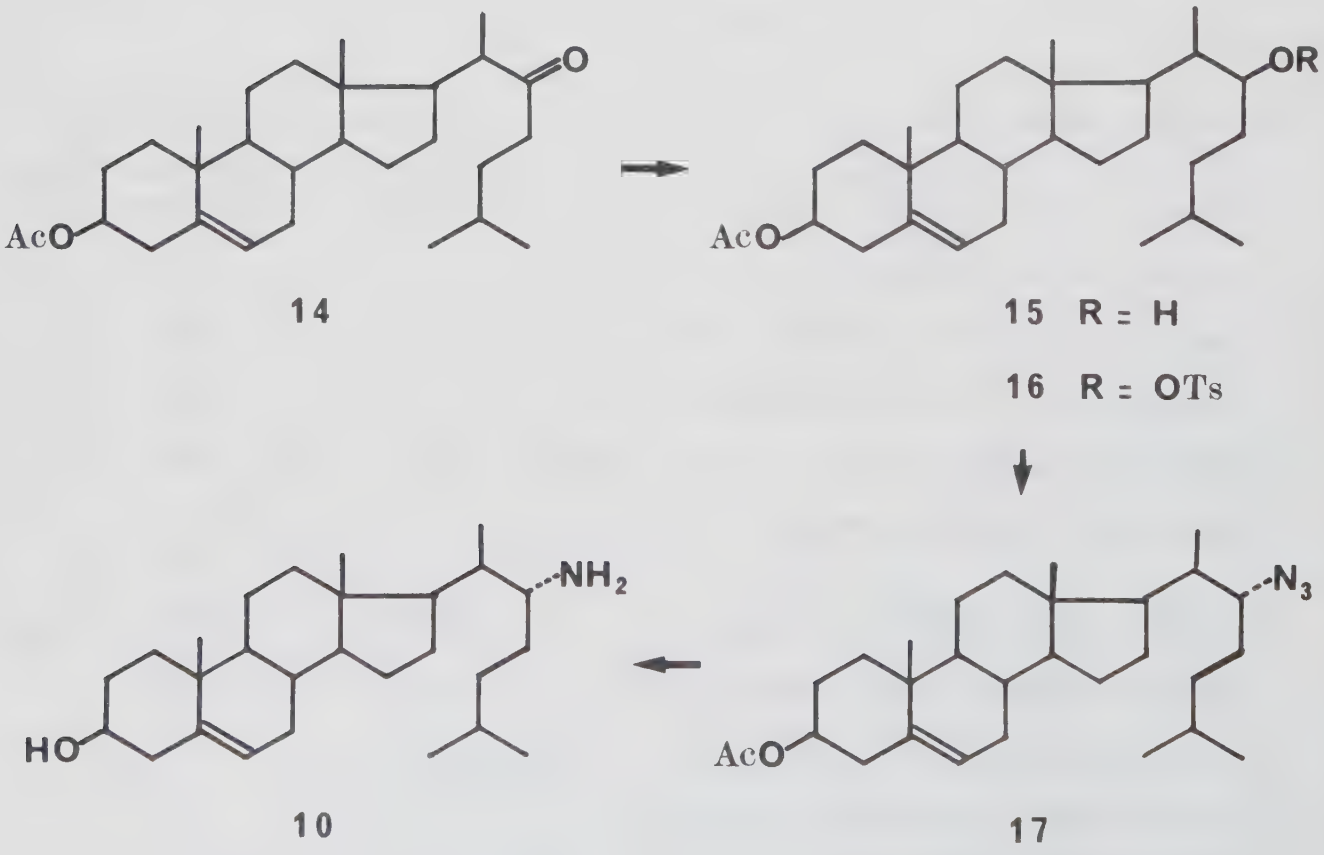
Structure	α_D : 22R	α_D : 22S
Hydroxy-22 cholestérol.....	- 38°	- 54°
Benzoyloxy-3 β cholestène-5 ol-22.....	- 18°	- 28°
Benzoyloxy-3 β ,22 cholestène-5.....	- 8°	- 25°
Méthoxy-3β cholestène-5 ol-22.....	- 52°	- 60°
Acétoxy-3β ,22 cholestène-5.....	- 37°	- 59°
Amino-22 cholestérol.....	- 37°	- 45°
N-benzoylamido-22 cholestérol.....	- 25°	- 45°
N-acétoxyamido-22 cholestérol.....	- 31°	- 48°
Benzoyloxy-3β azido-22 cholestène-5..	+ 6°	- 19°

4° Synthèse stéréospécifique de l'amino-(22R) cholestérol

L'amine (22R) s'étant révélée très active biologiquement, une synthèse a été étudiée, permettant l'obtention de ce produit, en quantité importante, pour les tests biologiques.

La difficile séparation par chromatographie des deux alcools en 22 peut être évitée, en réduisant l'acétoxy-3β céto-22 cholestène-5 **14** par $LiAl(O\text{-}tBu)_3H$. On obtient alors, exclusivement, l'acétoxy-3β cholestène-5 ol-(22S) **15** .

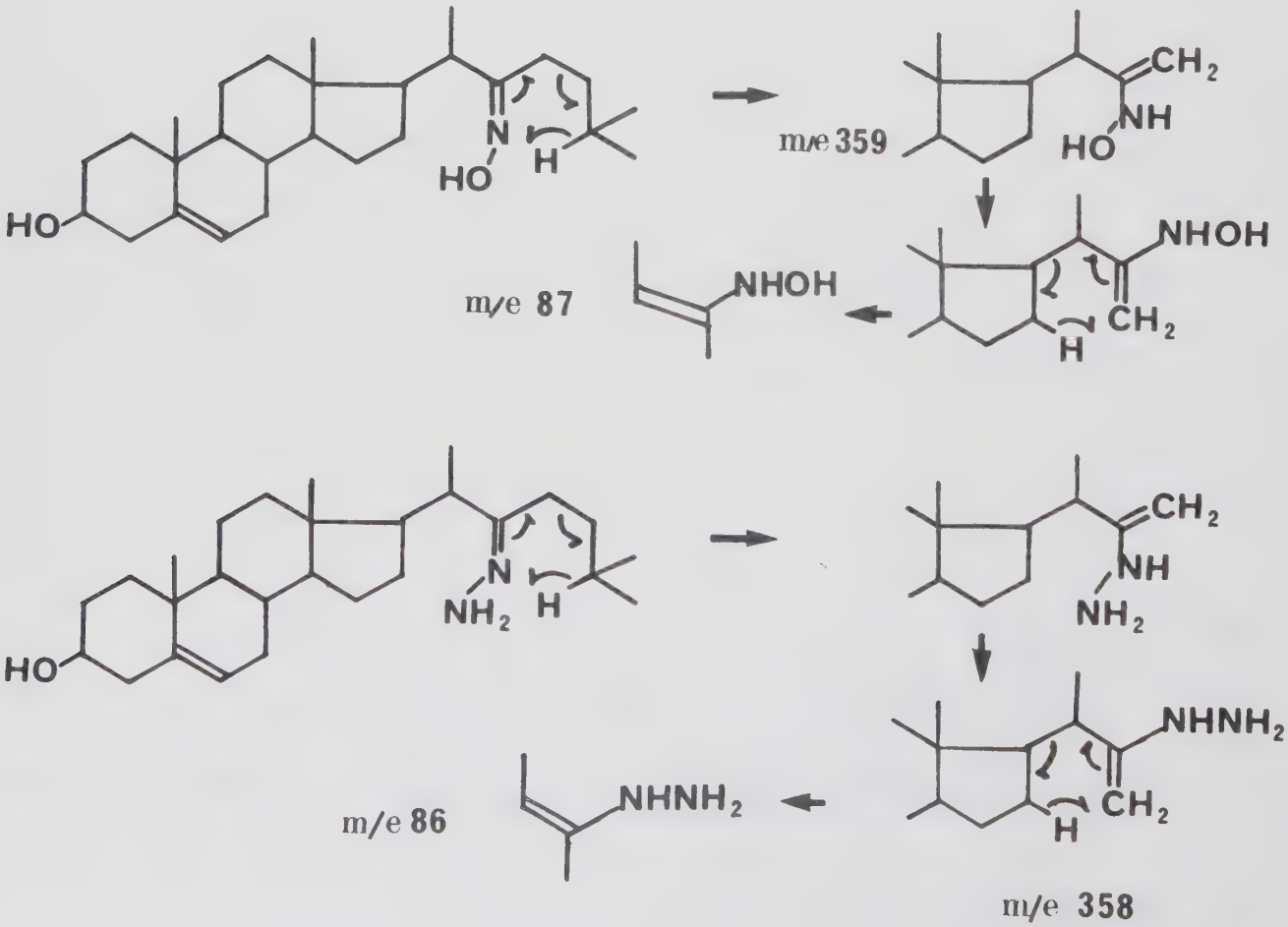
Après azidolyse du tosylate **16** , donnant l'acétoxy-3β azido-(22R) cholestène-5 **17** , on obtient, par réduction avec $LiAlH_4$, l'amino-(22R) cholestérol **10** , avec un rendement d'environ 50 %, par rapport à la cétone-22 **14** de départ.



Cependant, si l'on dissout le céto-22 cholestérol dans la pyridine, en présence de chlorhydrate d'hydroxylamine, et que l'on maintient cette solution à 90° pendant 2 jours, on obtient de l'oxime cristallisé, avec un rendement de 40 %.

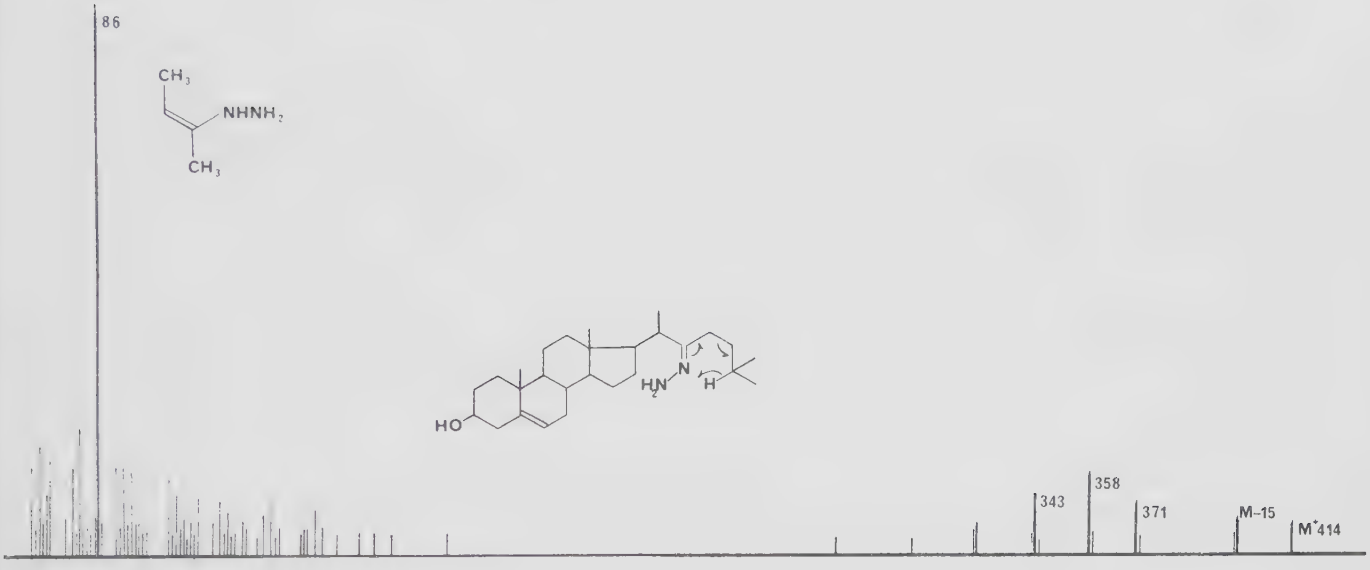
L'hydrazone a été obtenu en portant à reflux, pendant 48 heures, une solution de céto-22 cholestérol dans l'éthanol absolu, en présence d'hydrate d'hydrazine. On obtient l'hydrazone avec un rendement de 55 %.

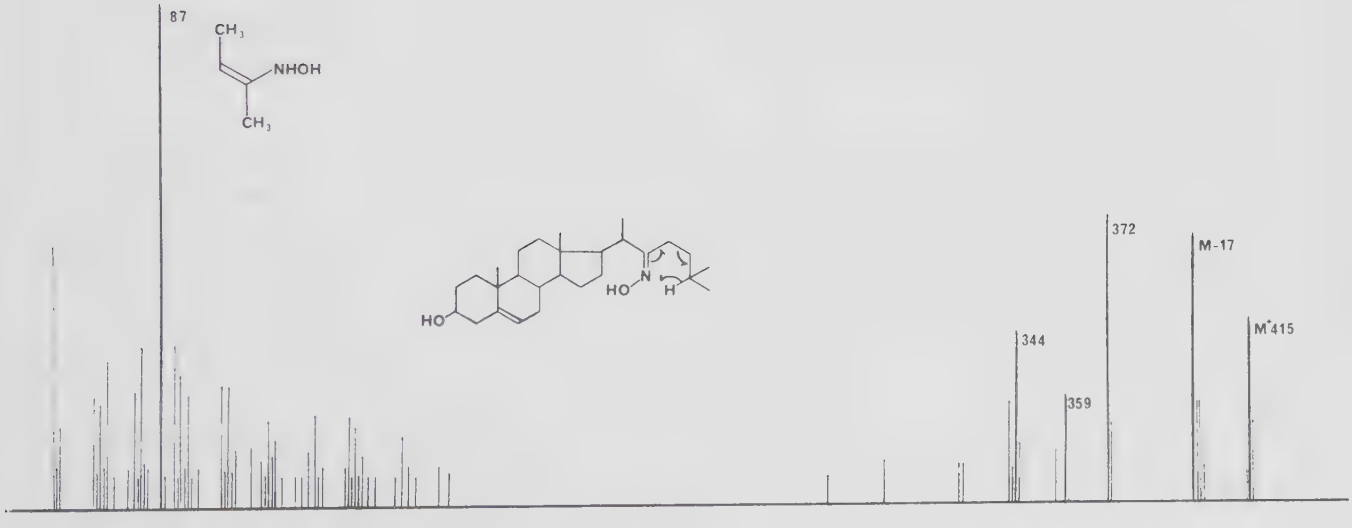
Ces deux composés donnent un spectre de masse caractéristique : on observe, en effet, une fragmentation de la chaîne latérale selon un Mc LAFFERTY, suivi d'un deuxième réarrangement.



Dans le cas de l'oximo-22 cholestérol **18** , le premier réarrangement conduit à l'ion m/e = 359, correspondant à la coupure de la liaison C_{23-24}, suivi du deuxième réarrangement, libérant le reste de la chaîne latérale, pour donner le pic de base m/e = 87.

De même, on observe pour l'hydrazone-22 **19** , un pic à m/e = 358 et un pic de base m/e = 86.





2° Réduction de l'oximo-22 cholestérol **18**

Connaissant la configuration des amino-22 cholestérol, la stéréosélectivité de la réduction de l'oximo-22 cholestérol a pu être déterminée.

On obtient en majorité, en réduisant cette oxime par $LiAlH_4$ dans le dioxanne, à reflux pendant 48 heures, l'amino-(22S) cholestérol (66 %) **11** .

Par contre, la réduction par le lithium dans l'éthylamine, conduit au mélange d'amines épimères $\left[-NH_2\text{-}(22R) : -NH_2\text{-}(22S)\right]$, dans des proportions inverses (60 : 40).

C/ DETERMINATION DE LA CONFIGURATION ABSOLUE DES SUBSTITUANTS EN C-22 PAR RMN DU ^{13}C [24]

La seule méthode connue jusqu'à présent, pour déterminer la configuration absolue des alcools en 22, est la méthode de HOREAU et PRELOG.

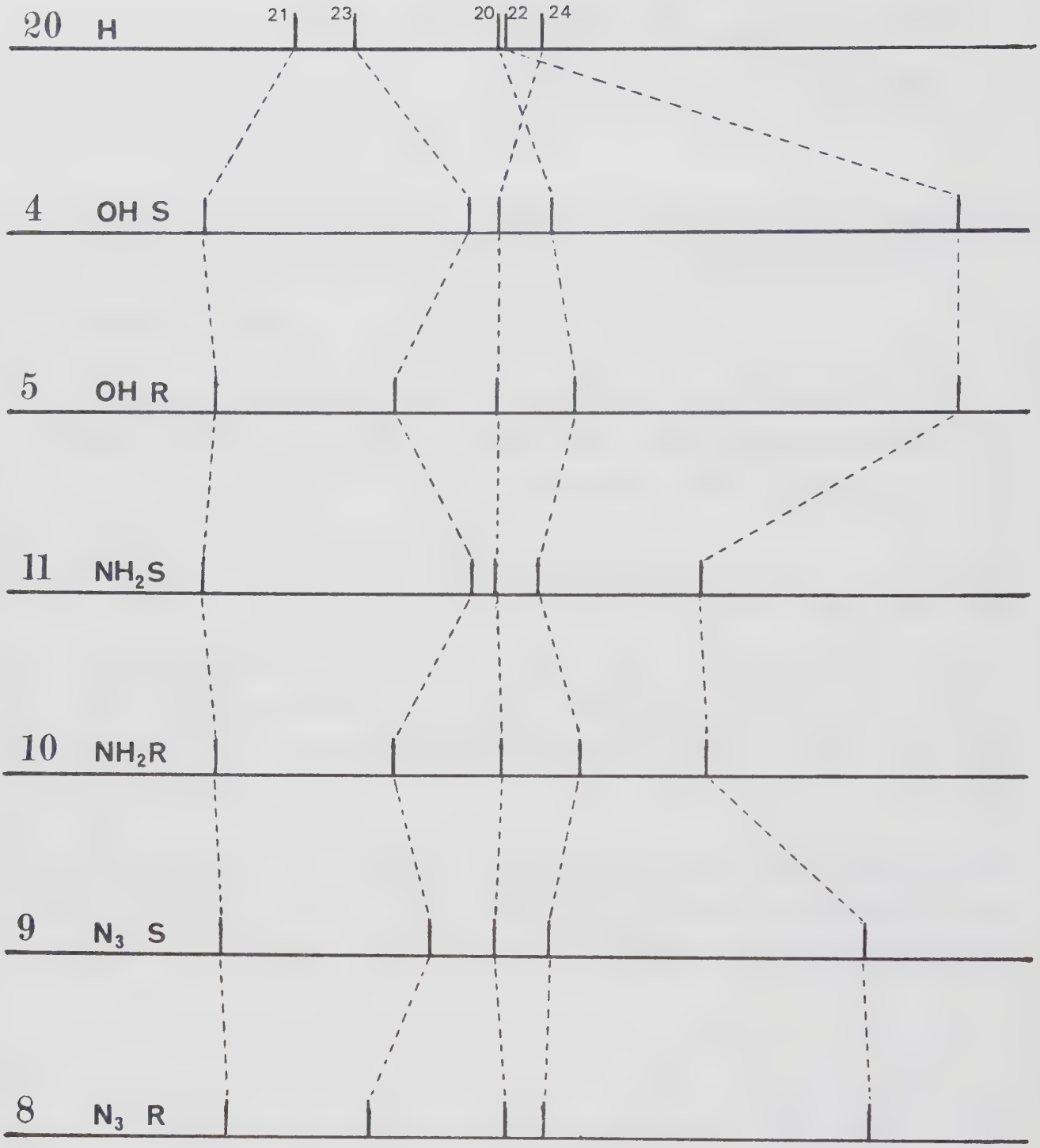
En effet, une récente communication[25] affirme que la RMN du ^{1}H ne permet pas de différencier les hydroxy (22R) et (22S) cholestérol.

Les spectres protoniques des amino-(22R) et (22S) cholestérol ne comportent également, aucune différence notable.

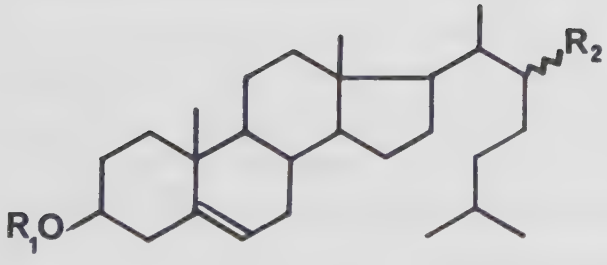
Par contre, la RMN du ^{13}C permet d'obtenir rapidement, la configuration absolue des substituants en C-22.

Les spectres de découplage par bruit, et les spectres de découplage partiel, pour les dérivés en (22R) et (22S) du cholestérol **4**, **11**, **9**, **5**, **10** et **8** , ainsi que celui du benzoate de cholestérol **20**, ont été enregistrés.

Par application des règles de déplacement chimique, et par comparaison avec l'analyse antérieure[26] du spectre du cholestérol, on obtient l'attribution suivante des signaux :


20 H
21
23
20
22
24
4 OH S
5 OH R
11 NH2S
10 NH2R
9 N3 S
8 N3 R

	20	4	11	9	5	10	8
C-17.....	56,3	52,6	52,9	53,2	53,2	53,3	52,8
C-18.....	11,9	11,8	11,8	11,8	11,9	11,8	11,8
C-20.....	35,8	40,3	39,5	40,5	42,6	42,7	40,1
C-21.....	18,8	11,6	11,3	12,7	12,5	12,3	13,5
C-22.....	36,3	73,8	52,9	66,5	74,0	53,3	66,9
C-23.....	23,9	33,3	34,2	30,5	27,5	27,6	25,4
C-24.....	39,6	35,7	36,2	36,1	36,1	36,6	36,7
C-25.....	28,0	27,8	27,6	28,1	27,9	28,2	28,0
C-26.....	22,6	22,6	22,6	22,6	22,5	22,3	22,4
C-27.....	22,8	22,6	22,6	22,6	22,9	23,0	22,9



20 $R_1 = COC_6H_5$; $R_2 = H$

4 $R_1 = COC_6H_5$; $R_2 = OH$ (22S)

11 $R_1 = H$; $R_2 = NH_2$ (22S)

9 $R_1 = COC_6H_5$; $R_2 = N_3$ (22S)

5 $R_1 = COC_6H_5$; $R_2 = OH$ (22R)

10 $R_1 = H$; $R_2 = NH_2$ (22R)

8 $R_1 = COC_6H_5$; $R_2 = N_3$ (22R)

Les spectres de ^{13}C ont été effectués en solution dans le $CDCl_3$ (0,3M), avec un spectromètre Bruker HX-90E F.T., à 22,63 MHz.

Les déplacements chimiques (± 0,1 ppm) sont donnés par rapport au tétraméthylsilane, comme référence interne (TMS = 0). La position de résonnance des carbones énumérés ci-dessous, est seulement faiblement influencée par les changements structuraux de la chaîne latérale :

C- 1 = 38,2 ± 0,1 ;	C- 2 = 28,0 ± 0,2 ;	C- 3 = 74,5 ± 0,1
C- 4 = 37,0 ± 0,1 ;	C- 5 = 139,7 ± 0,2 ;	C- 6 = 122,6 ± 0,1
C- 7 = 31,9 ± 0,1 ;	C- 8 = 31,9 ± 0,1 ;	C- 9 = 50,0 ± 0,1
C-10 = 36,6 ± 0,1 ;	C-11 = 21,1 ± 0,1 ;	C-12 = 39,8 ± 0,1
C-13 = 42,3 ± 0,2 ;	C-14 = 56,4 ± 0,3 ;	C-15 = 24,2 ± 0,2
C-16 = 28,1 ± 0,2 ;	C-19 = 19,4 ± 0,1 ;	CO = 165,9 ± 0,1

carbone aromatique substitué = 132,6 ± 0,1 ;
carbone p. = 130,8 ± 0,1 ; l'attribution spécifique des carbones o. et m. ne peut être faite : 129,5 ± 0,1 et 128,2 ± 0,1

Les composés aminés -(22S) et (22R), 11 et 10, sont enregistrés avec un groupement hydroxylé en C-3. Les déplacements chimiques de ces deux composés, de C-1 à C-16 et C-19, sont identiques à ceux publiés antérieurement [26] .

Dans le spectre de l'hydroxy-(22S) cholestérol d4-(20, 22, 23, 23), les signaux 40,3, 73,8 et 33,3 ppm, ne sont pas décelables, tandis que les carbones des cycles A et B montrent des résonnances identiques à celles observées pour les spectres 11 et 10.

Par rapport aux positions de résonnance dans le spectre 20, les C-22, C-20, et C-23 sont déblindés, alors que les C-17, C-21 et C-24 sont blindés, dans tous les composés étudiés.

Ces variations de déplacement chimique sont aisément interprétables d'un point de vue qualitatif, comme étant la conséquence des effets α, β et γ[27]

Cependant, un examen du tableau ci-dessus, montre que l'amplitude de l'effet β est totalement différente pour les composés (22S) et (22R).

Si l'on considère les spectres de 4, 11, 5 et 10, l'effet β moyen sur C-20, est de 4,1 et 6,8 ppm respectivement, pour la série S et R.

Pour le déplacement chimique de C-23, une différence encore plus prononcée, est observée entre les deux séries. L'effet β, dans ce cas, est plus important pour les composés S, que pour les composés R (9,8 et 3,6 ppm).

De petites différences sont également mises en évidence entre les deux séries, pour les carbones en γ C-21 et C-24. Ainsi, les signaux des composés R apparaissent légèrement vers les champs plus faibles, que ceux des composés S.

Si l'interprétation de l'amplitude des effets observés n'est pas aisée, les résultats semblent être suffisamment cohérents et caractéristiques, pour permettre une identification de la configuration absolue des épimères en C-22.

Les conclusions ont été vérifiées au sujet d'un composé de grand intérêt biologique, qui porte une fonction hydroxyle, en position (22R) : l'α-ecdysone[28]. Ainsi, les déplacements chimiques de C-20 (41,9 ppm) et de C-23 (25,3 ppm), sont en accord avec les valeurs trouvées pour le composé (22R)5, en tenant compte du facteur correctif, d'environ 3 ppm sur C-23, dû à l'effet γ de l'hydroxyle du C-25.

CHAPITRE II

SYNTHESE du METHYL-20 CHOLESTEROL

Pour obtenir le méthyl-20 cholestérol, nous avons estimé que trois voies de synthèse étaient possibles par :

- méthylation de l'hydroxy-3β cholestadiène-5,20 (22) one-23,

- C-méthylation du méthoxy-6β cyclo-3α, 5α bisnor-23,24 cholanal-22,

- C-méthylation par énolisation régiospécifique du tétrahydropyrannyloxy-(20R) céto-22 cholestérol.

Nous avons jugé nécessaire de les étudier, systématiquement, en vue de sélectionner la plus intéressante.

Méthylation de l'hydroxy-3β cholestadiène-5,20(22)one-23

A/ SYNTHESE DE L'ACETOXY-3 β NOR-24 CHOLADIENE-5,20 (22) AL-23[29]

1° Réarrangement acido-catalysé du (20S) acétoxy-3β vinyl-20 prégnène-5 ol-20

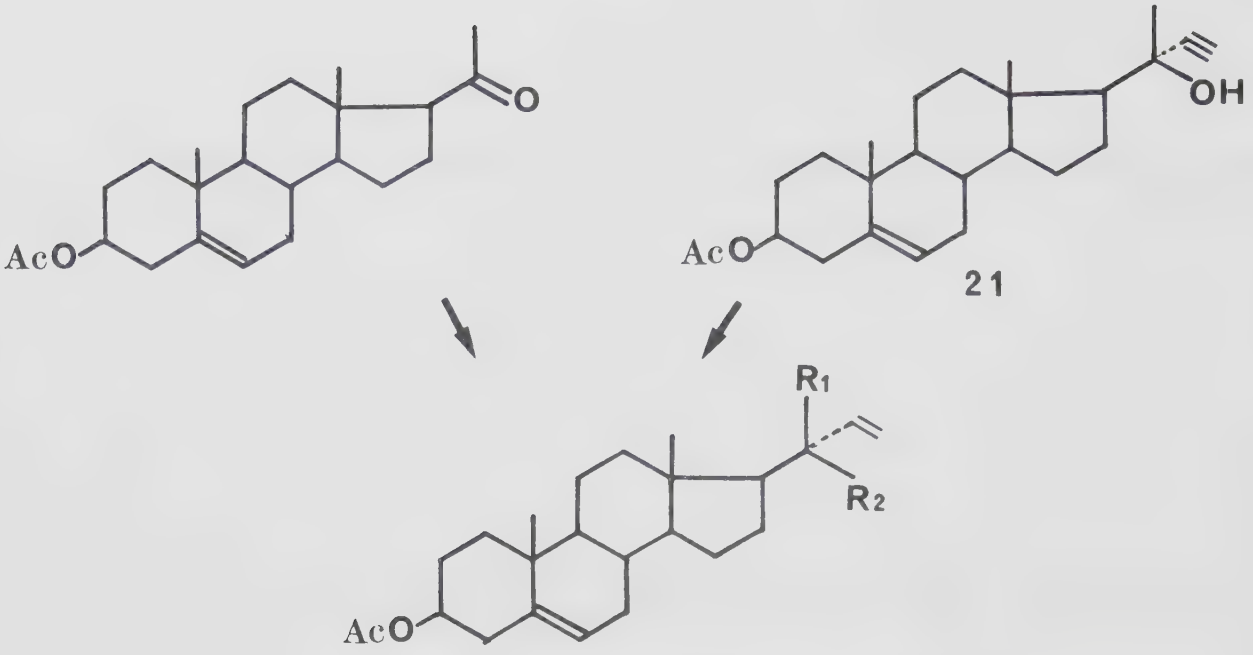
La synthèse des épimères (20R) et (20S) de l'acétoxy-3β vinyl-20 prégnène-5 ol-20 a été obtenue par addition de bromure de vinyl magnésium, sur l'acétate de prégnénolone, suivie d'une réacétylation.

Les alcools épimères (20S) **22** et (20R) **23** ont été isolés dans le rapport 11 : 1.

Il est admis que la stéréochimie des additions nucléophiles, sur une cétone en 20, respecte la règle de CRAM[30] . Dans le cas présent, on devrait obtenir l'épimère (20S) majoritaire.

Ceci est confirmé par la réduction sélective avec le catalyseur de LINDLAR[31] , du produit de configuration connue[32]: le (20S) acétoxy-3β éthynyl-20 prégnène-5 ol-20 **21** .

Le carbinol vinylique ainsi obtenu, est en tous points identique à **22** .



22 R_1=CH_3 R_2=OH 20S

23 R_1=OH R_2=OH 20R

Les 3 protons du groupe vinylique des 2 épimères donnent en RMN un système ABX :

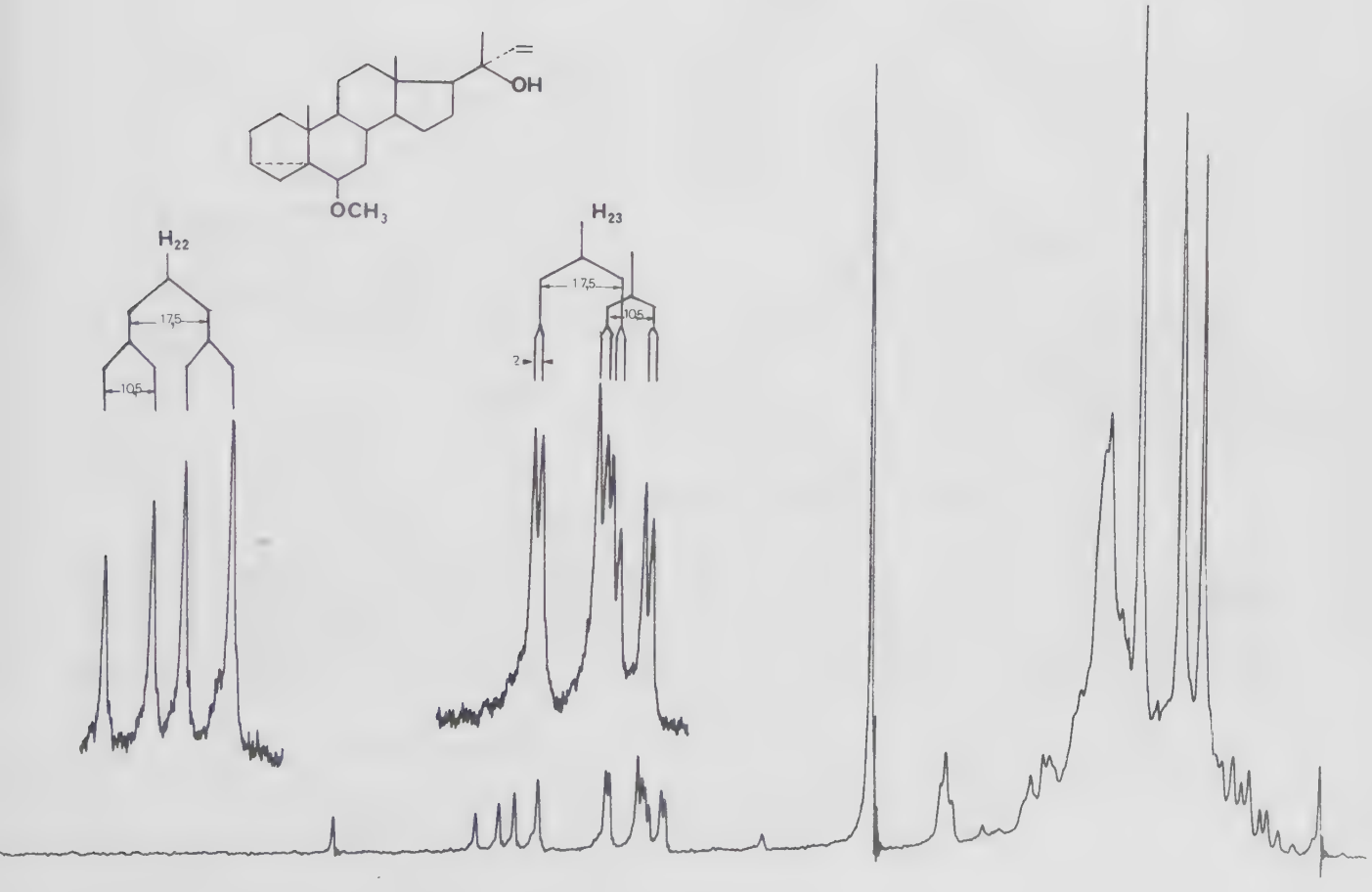
- le proton H_{22} (partie X) est sous forme d'un doublet dédoublé (J_{cis} = 10,5 Hz et J_{trans} = 17,5 Hz), centré à 6,05 ppm pour l'épimère (20S) [22] et à 6,07 ppm pour l'épimère (20R) [23] ;

- le proton H_{23cis} (partie AB) est sous forme d'un doublet (J_{cis} = 10,5 Hz), dédoublé (J_{gem} = 2 Hz), centré à 4,93 ppm pour l'épimère (20S) et à 5,00 ppm pour l'épimère (20R) ;

- le proton $H_{23trans}$ (partie AB) est sous forme d'un doublet (J_{trans} = 17,5 Hz), dédoublé (J_{gem} = 2 Hz), centré à 5,13 ppm pour (20S) et à 5,21 ppm pour (20R).

COMPARAISON DES SPECTRES RMN de 22 et 23

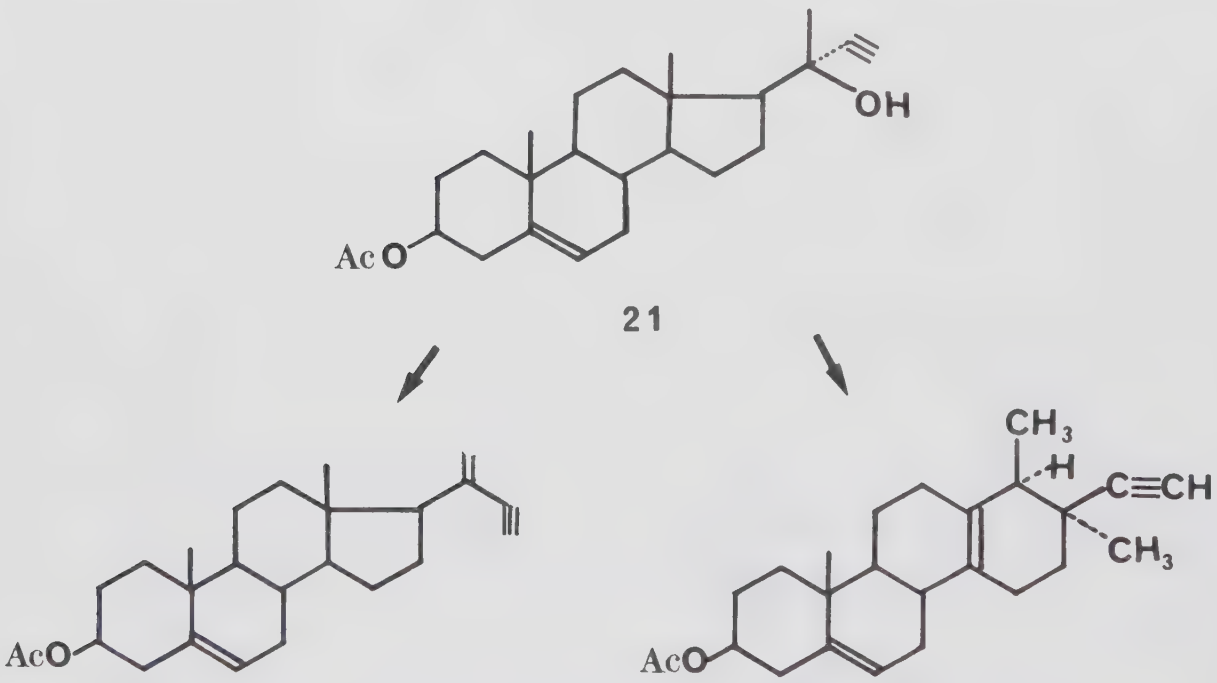
	CH_3-18	CH_3-21	H-22	H-23 cis	H-23 trans
20S	0,86	1,40	6,05	4,93	5,13
20R	0,80	1,24	6,07	5,00	5,21



Au cours de l'étude de ce réarrangement allylique, on observe la formation de produits d'élimination qu'il est intéressant de comparer avec ceux obtenus à partir de **21** .

En effet, les études antérieures[32-33] sur les réarrangements acido catalysés de l'alcool tertiaire en 20, ont mis en évidence des produits d'élimination avec homologation du cycle D.

Ainsi, le (20S) acétoxy-3β éthynyl-20 prégnène-5 ol-20 **21**, donne, par réaction d'élimination, dans l'acide acétique, en présence d'une quantité catalytique d'acide sulfurique, les deux composés suivants :



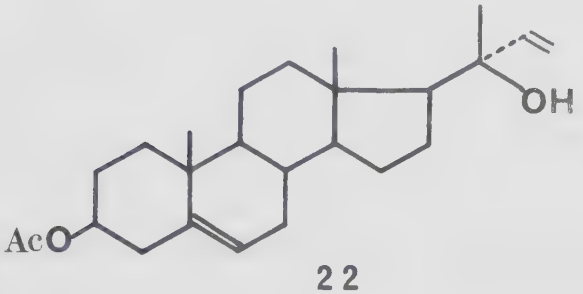
21

On doit noter que, dans le cas du vinyl carbinol **22** , le réarrangement du carbocation en 20, impliquant la migration de la liaison 13-17 ou 16-17, sur l'ion carbonium en C-20, n'a pas été observé.

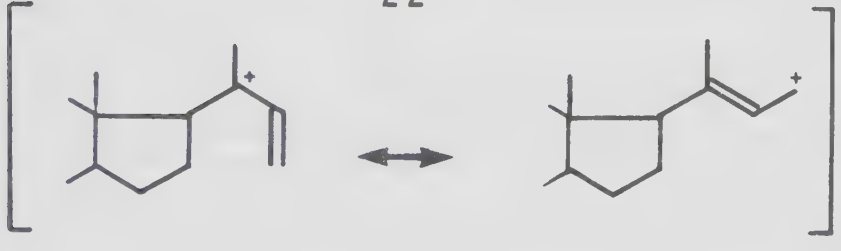
Généralement la déshydratation provoquée par des acides forts, conduit, par un mécanisme E_1, à l'oléfine de type SAYTZEFF.

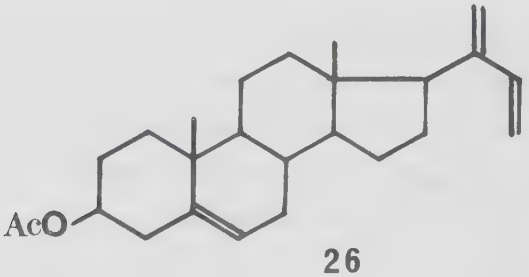
L'oléfine **27** de ce type, a été obtenue dans l'acide acétique, à 100°, en présence de quantité catalytique d'acide p toluène sulfonique.

Dans les mêmes conditions, mais à 25°, pendant 72 heures, on obtient l'oléfine de type HOFMANN **26**. L'acide sulfurique, dans le dioxanne à 100°, conduit également, à l'oléfine **26**.

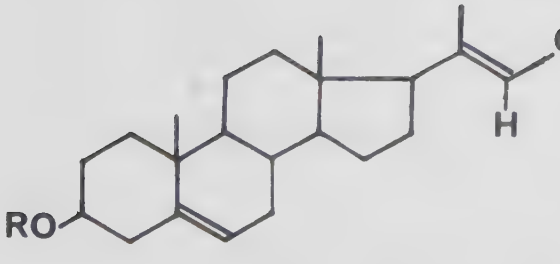


22



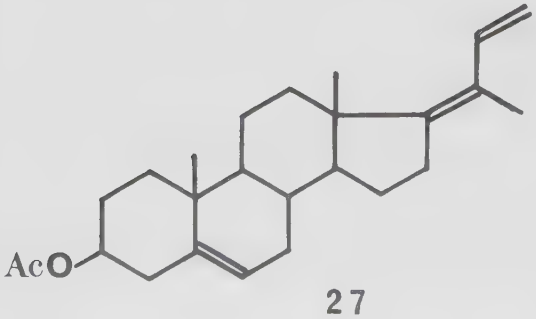


26



24 R=$COCH_3$

25 R=H



27

REACTIONS ACIDO-CATALYSEES DU CARBINOL 22

Réactifs et conditions				Produits en %		
				26	24	27
AcOH.....	TsOH	25°	72 h	20	50	
AcOH.....	TsOH	100°	1/4 h		30	60
AcOH.....	I_2	100°	1/2 h	15	75	
$POCl_3$.....	pyr.	100°	3 h	80		
PBr_3, AcOK.....	bz	25°	20 h		85	
H_2SO_4.....	diox	100°	1 h	75		

a) Structure de l'acétoxy-3β nor cholatriène-5, 20, 22 **26**

L'infrarouge indique l'absence de fonction hydroxylée.

La RMN montre la présence de six protons oléfiniques et l'absence d'un groupe méthyle sur une liaison insaturée. Le proton H-22 apparaît sous forme d'un doublet dédoublé (J_{cis} = 11 Hz et J_{trans} = 17,5), centré à 6,42 ppm. Les cinq autres protons : 2 H-22, 2 H-21 et H-6, sont situés entre 4,90 et 5,50 ppm.

L'absorption U.V a un maximum à 228 nm (ϵ = 11 500), caractéristique d'un diène conjugué monosubstitué.

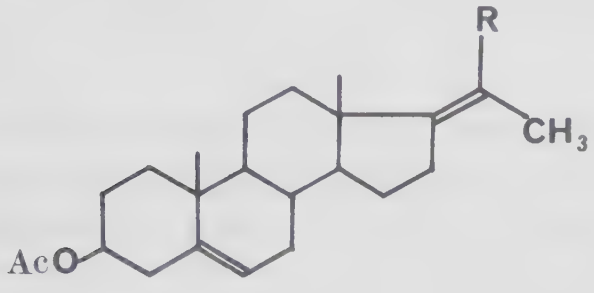
Ces données spectrales sont en accord avec la structure **26**.

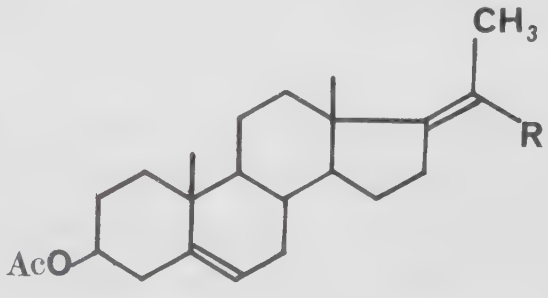
b) Structure de l'acétoxy-3β nor cholatriène-5, 17(20), 22 27

Le spectre infrarouge du triène 27, indique l'absence de fonction hydroxylée.

L'absorption U.V a un maximum à 240 nm (ϵ : 13 000), en accord avec la valeur calculée de 238 nm.

La stéréochimie Z de la double liaison 17-20 a été déterminée en comparant la position et l'aspect du pic méthyle C-21, avec les dérivés suivants : 27 a et 28 a ; 27 b et 28 b ; 27 c et 28 c, de configuration en 17-20 connue[32] .





Z
a : R = CN
b : R = C≡CH
c : R = $COOCH_3$

E
a : R = CN
b : R = C≡CH
c : R = $COOCH_3$

Configuration Z singulet élargi	CH_3-21		Configuration E triplet : J = 1,5
1,76	27		
1,80	27 a	28 a	1,92
1,76	27 b	28 b	1,98
1,75	27 c	28 c	1,90

La configuration Z de ce composé est thermodynamiquement la plus stable.

En effet, dans la configuration E, le méthyle C-21 serait en interéaction stérique avec le méthylène C-12.

Par contre, dans la configuration Z, le groupe vinyle est coplanaire, ce qui augmente sa distance avec C-12.

c) Réarrangement allylique :

structure du diacétoxy-3β , 23 nor-24 choladiène-5, 20 (22) **24**

Le spectre RMN montre un pic à 1,74 ppm, attribuable à un groupe méthyle sur un carbone insaturé. On observe également, deux pics acétate, à 2,06 et 2,08 ppm, et un doublet (J = 7 Hz), centré à 4,64 ppm, correspondant aux deux protons C-23.

2° Oxydation du dihydroxy-3β,23 nor 24 choladiène-5, 20 (22) 25

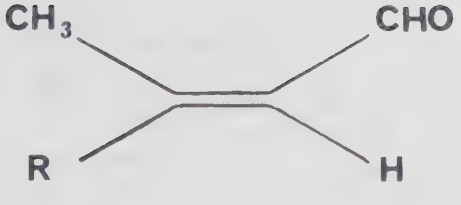
Après saponification du diacétate **24**, pour donner le diol **25**, on oxyde ce dernier par le D.D.Q.

L'aldéhyde conjugué **28** obtenue, est caractérisé par :

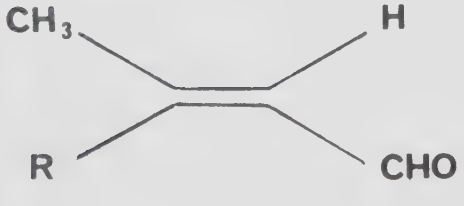
- une bande à l'infrarouge à 1 640 cm^{-1}
- une absorption U.V maximum à 247 nm
- un doublet centré à 10,1 ppm en RMN

La stéréochimie E de la double liaison 20-22, est compatible avec la position du signal méthyle C-21 à 2,2 ppm.

En effet, FAULKNER[34] a montré, sur un grand nombre d'oléfines tri-substituées ($R > CH_3$) de type I et II, que la position moyenne des protons méthyliques sur une oléfine de stéréochimie E est à 2,15 ppm, tandis qu'elle se situe à 1,96 ppm sur une oléfine de stéréochimie Z.



I



II

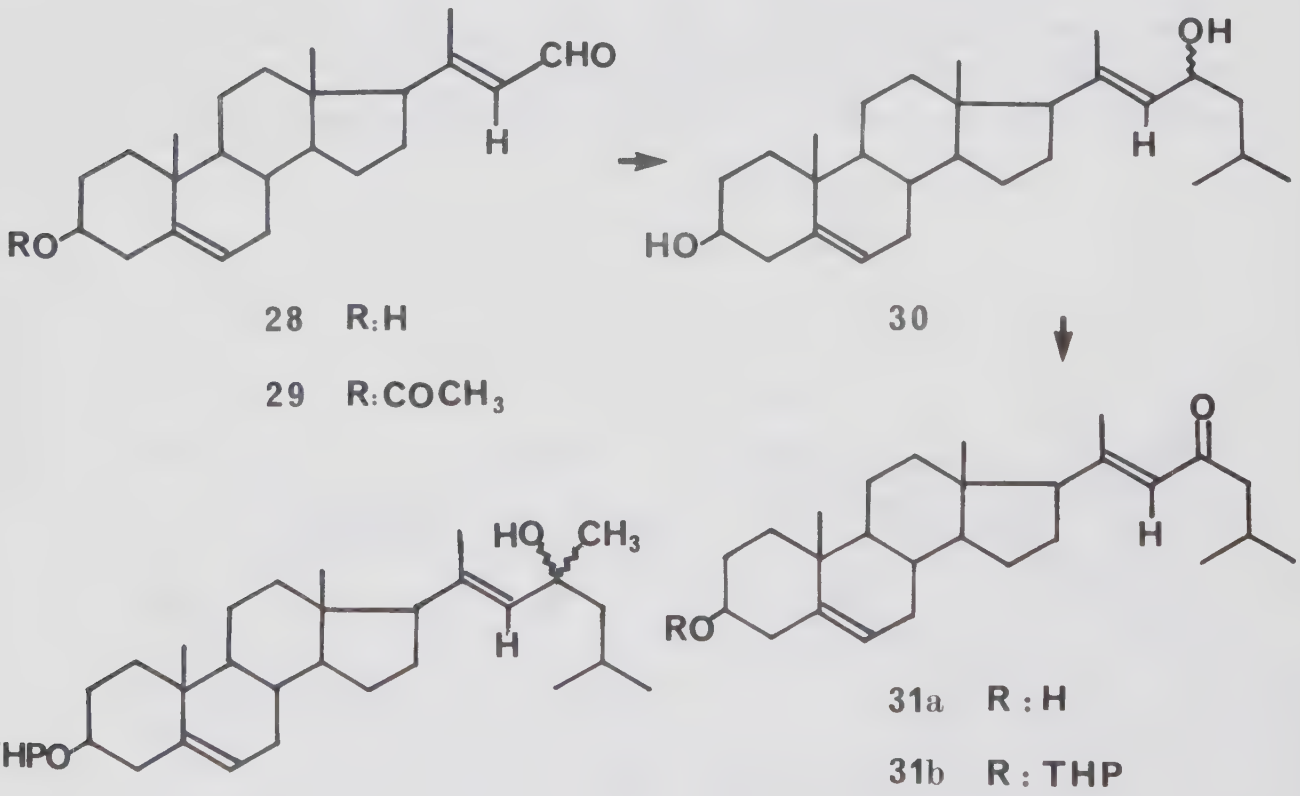
B/ SYNTHESE DE L'HYDROXY-3β CHOLESTADIENE-5,20 (22) ONE-23 31a

On obtient le dihydroxy-3β ,23ξ cholestadiène-5,20 (22) **30** , par addition du bromure de méthyl-2 propane magnésium sur **28** .

Le diol **30** est alors oxydé, par le D.D.Q., pour donner **31a** .

La cétone conjuguée est caractérisée par deux bandes à l'infrarouge à 1 595 et 1 660 cm^{-1}. D'autre part, le spectre RMN signale le proton oléfinique H-22 à 6,1 ppm.

La stéréochimie E, de la double liaison 20-22, est démontrée par la position du pic méthyle 21 (singulet élargi) à 2,15 ppm.



C/ METHYLATION DE LA CETONE CONJUGUEE 31b

L'essai de méthylation 1-4 sur la cétone conjuguée par l'iodure de méthyle magnésium, en présence de chlorure cuivreux, ou par le $LiCuMe_2$,[35] n'a pu aboutir.

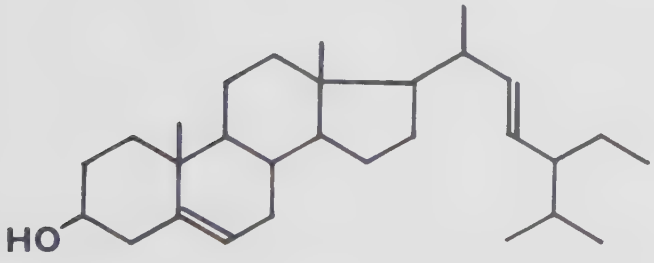
En effet, seul le produit d'addition 1-2 sur la cétone en C-23 **32** a pu être obtenu. Le spectre RMN de ce composé montre le pic méthyle 21 à 1,85 ppm, et le pic méthyle sur le carbone 23 à 1,34 ppm.

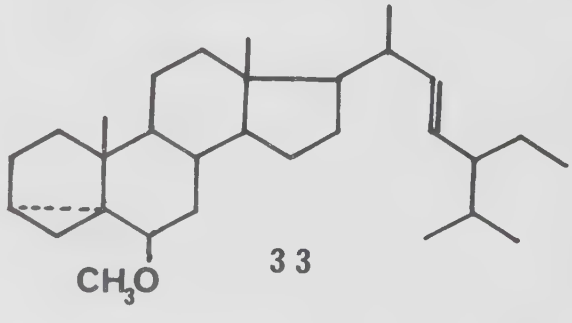
Méthyl-20 cholestérol par C-méthylation du méthoxy-6β cyclo-3α,5α bisnor-23,24 cholanal-22

L'aldéhyde de départ **34** a été obtenu selon la méthode suivante[36]:

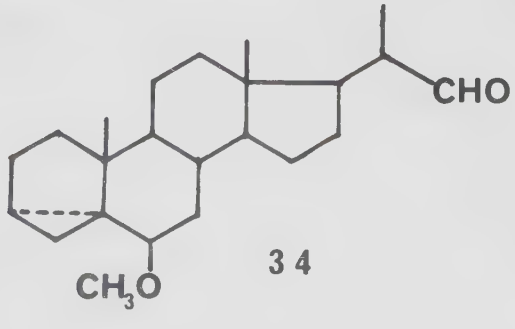
la liaison 5-6 insaturée du stigmastérol est protégée par la transformation de ce composé en éther de i-stigmastérol **33** .

Ce produit est alors ozonolysé, pour donner l'aldéhyde **34** , avec un rendement de 70 %.





33



34

A priori, il pouvait y avoir un choix entre :

- l'alkylation de l'aldéhyde **34** avec l'iodométhane, suivi de l'extension de la fonction aldéhyde, jusqu'à la chaîne complète du cholestérol,

- l'alkylation de **34** avec le bromure d'isohexyle, suivi de la conversion de l'aldéhyde, en méthyle.

La seconde voie de synthèse s'est avérée impossible car, invariablement, l'alkylation se fait sur l'oxygène de la fonction aldéhyde.

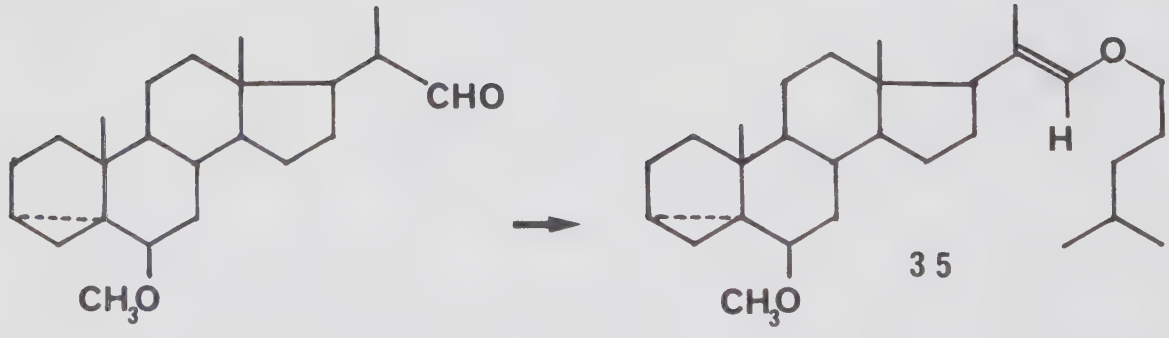
L'énol-éther obtenu **35** est caractérisé en RMN par :

- le proton oléfinique H-22 à 5,83 ppm,

- l'absence de proton aldéhydique, dans la région 9-11,

- le triplet, centré à 3,66 ppm, dû aux deux protons adjacents à l'oxygène.

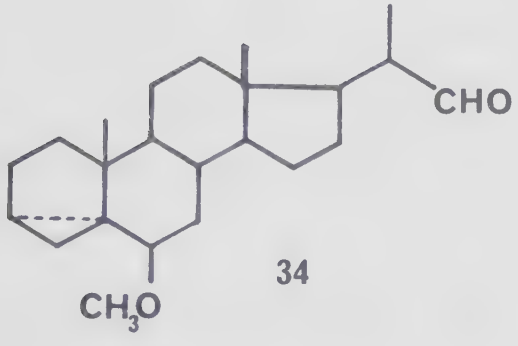
De plus, l'infrarouge montre une bande d'intensité moyenne à 1 660 cm^{-1}[37].



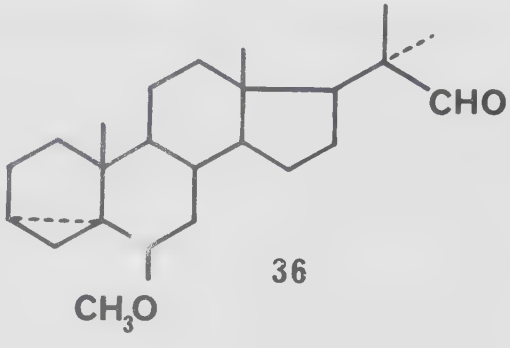
35

On obtient, par traitement de l'aldéhyde **34** , avec un excès d'iodométhane, en présence de t-butoxyde de potassium, dans le t-butanol, l'aldéhyde $\alpha\,\alpha$-diméthyl **36** , avec un rendement de 55 %.

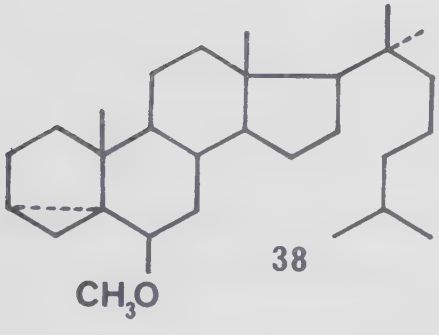
Sa structure est déterminée par la présence d'un singulet à 9,66 ppm, au lieu du doublet observé dans le produit de départ, dû au couplage (-CH-CHO).



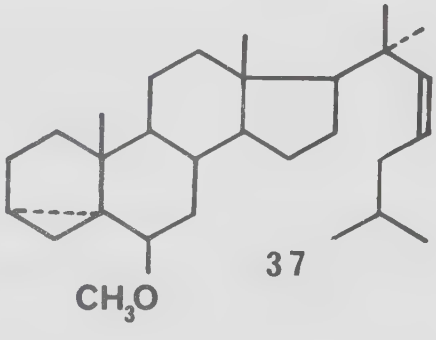
34



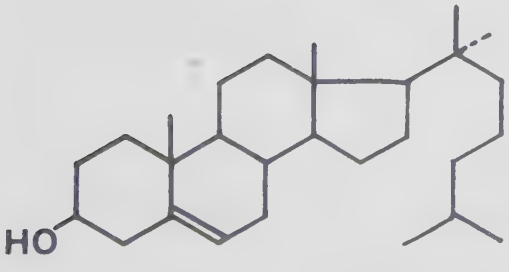
36



38



37



39

La stéréosélectivité de cette réaction a été étudiée. A cette fin, la réaction de méthylation a été effectuée avec ICD_3.

Le spectre RMN à 100 MHz, ne permet pas de différencier les deux méthyles en 20 ; on obtient, en effet, un seul pic à 1,12 ppm.

Cependant, à 250 MHz, nous avons observé une distinction entre les deux méthyles : le spectre du produit deutérié montre alors deux pics d'intensité différente, dans le rapport 60 : 40.

La méthylation de l'aldéhyde **34** n'est donc pas stéréosélective.

La réaction de WITTIG, sur l'aldéhyde **36** , selon la procédure de COREY [38] , avec le bromure de méthyl-3 butyltriphénylphosphonium, donne l'oléfine **37**, avec un rendement de 60 %.

La configuration Z de la double liaison 22-23 est attribuée pour les raisons suivantes :

- J.A. SVOBODA et al [36] ont observé que la réaction de WITTIG, dans les conditions de COREY, sur le méthoxy-6 β cyclo-3α, 5α bisnor 23, 24 cholanal-22 **34** , entraîne la formation exclusive d'oléfine Z.

  D'autres auteurs [39] ont constaté le même résultat lorsque la réaction de WITTIG est réalisée à partir d'aldéhydes diversement situés sur la chaîne latérale d'un stéroïde.

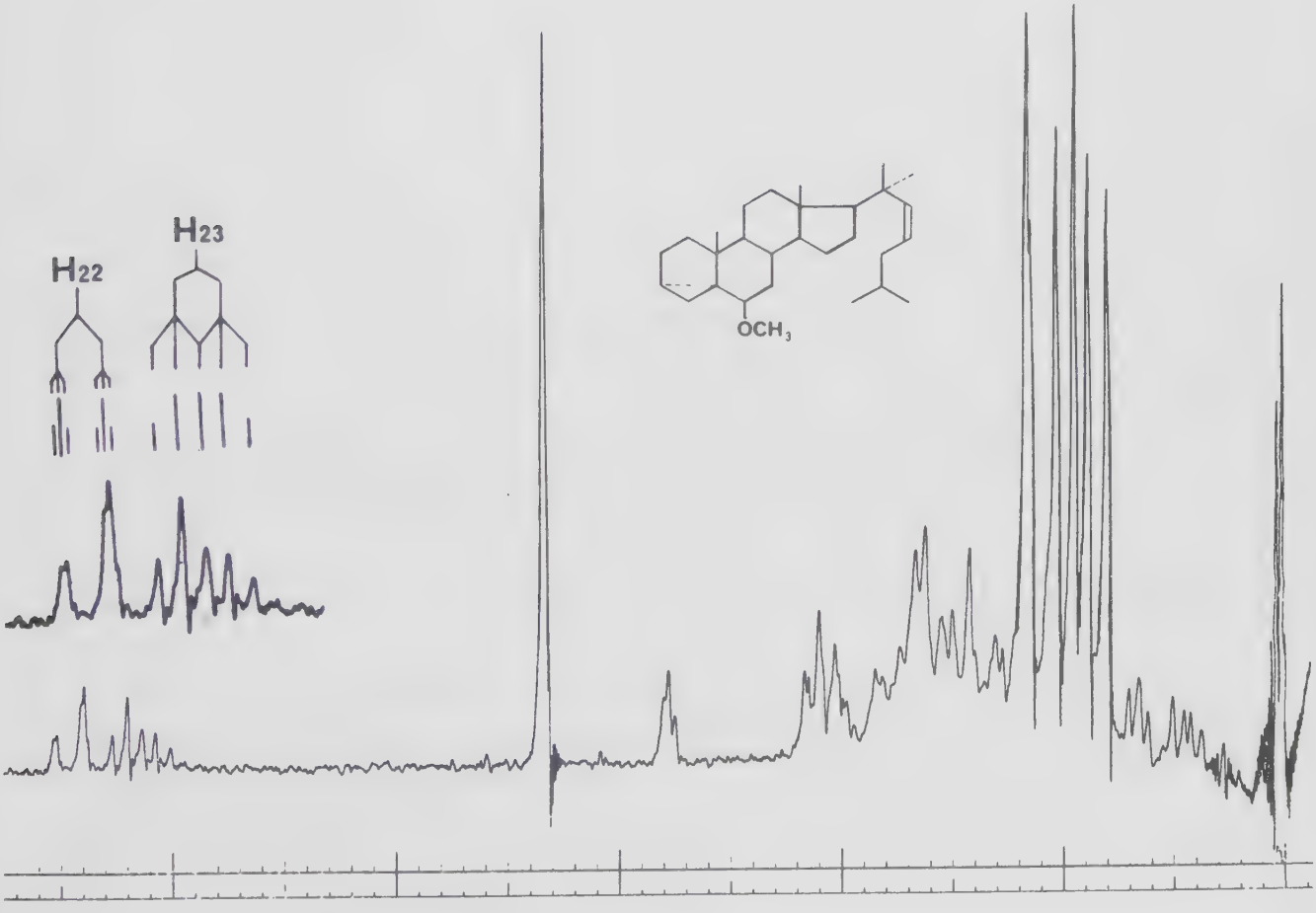
- l'absence à l'infrarouge d'une bande de forte intensité, vers 960 cm^{-1} caractéristique de la configuration Δ22 trans.

- l'analyse, dans la région oléfinique, du couplage des protons H-22 et H-23, (partie AB d'un système ABX^2), donne les résultats suivants :

  . le proton H-22 apparaît sous la forme d'un doublet de triplet (J_{22-23} = 12 Hz et J_{22-24} = 1 Hz), centré à 5,45 ppm ;

  . le proton H-23 apparaît également sous la forme d'un doublet de triplet (J_{22-23} = 12 Hz et J_{23-24} = 6 Hz), centré à 5,13 ppm.

La valeur J = 12 Hz est donc, dans ce type de structure, caractéristique d'un couplage cis entre H-22 et H-23.



L'oléfine **37** est catalytiquement réduite, et le produit **38** obtenu, est solvolysé pour donner le méthyl-20 cholestérol **39** , avec un rendement de 81 %.

Ce composé est caractérisé en RMN, par 2 singulets à 0,85 et 0,92 ppm (diméthyles en 20) et en spectrométrie de masse, par son pic moléculaire m/e = 400.

Méthyl-20 cholestérol par C-méthylation avec énolisation régiospécifique du tétrahydropyrannyloxy-(20R) céto-22 cholestérol

Le produit de départ choisi, pour introduire spécifiquement un groupe méthyle en C-20, est le tétrahydropyrannyloxy-(20R) céto-22 cholestérol **44** .

1° Synthèse de **44**

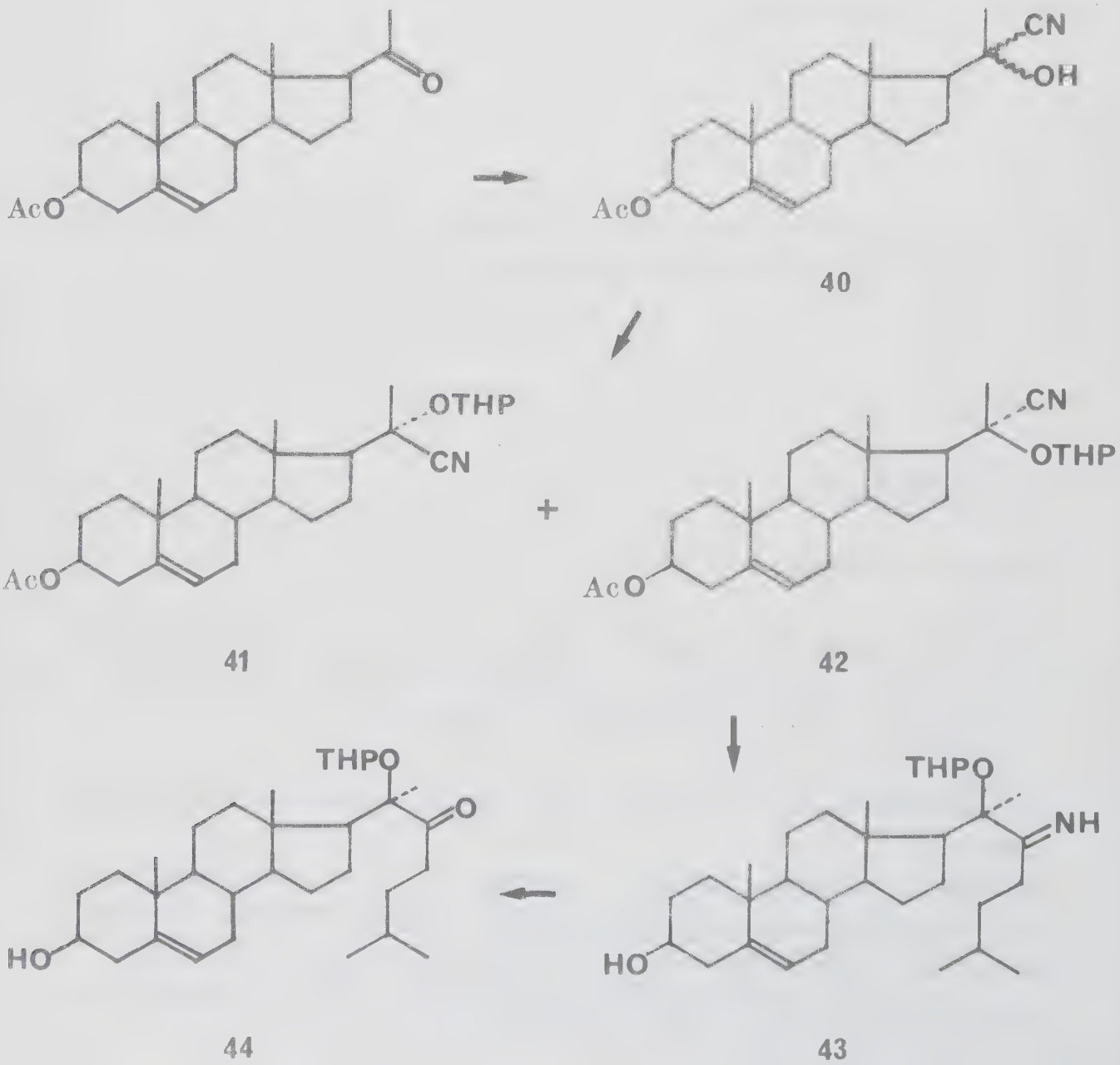
Ce composé s'obtient par les réactions suivantes :

- addition de HCN, par l'acétone cyanohydrine, sur la cétone en 20 de l'acétate de prégnénolone ; on obtient le mélange (20R) et (20S) d'acétoxy-3β hydroxy-20 prégnène-5 nitrile-20 **40** ;

- transformation de la fonction alcool en 20 en éther de tétrahydropyrannyle.
  A côté de l'épimère (20R) **42** déjà décrit [40] , nous avons isolé, par recristallisations successives de l'acétone, à partir des eaux-mères de cristallisation de **42** , l'épimère minoritaire (10 %) : le (20S) acétoxy-3β tétrahydropyrannyloxy-20 prégnène-5 nitrile-20 **41** ;

- addition sur le nitrile (20R) **42** du bromure d'isopentyle magnésium, donnant l'imine **43** ;

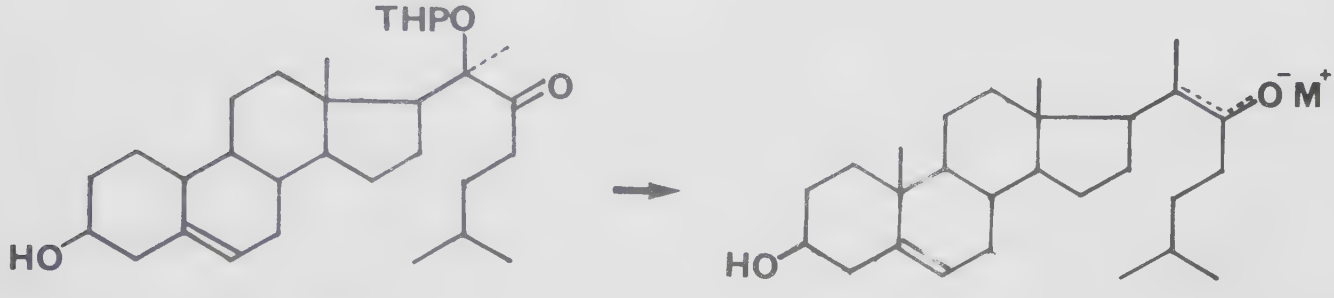
- hydrolyse acide de l'imine **43** , pour obtenir le tetrahydropyranny-loxy-(20R) céto-22 cholestérol **44** .



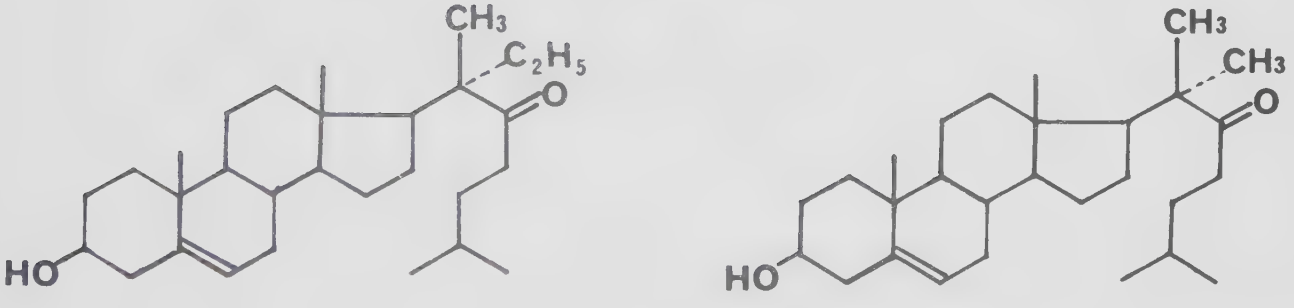
2° Alkylation de 44

L'énolisation régiospécifique de la cétone en 22 de **44** , est obtenue dans l'ammoniac liquide en présence de deux équivalents de calcium [41]

On procède alors à la méthylation en C-20, par addition d'un large excès d'iodométhane dans le THF.



44



46 **45**

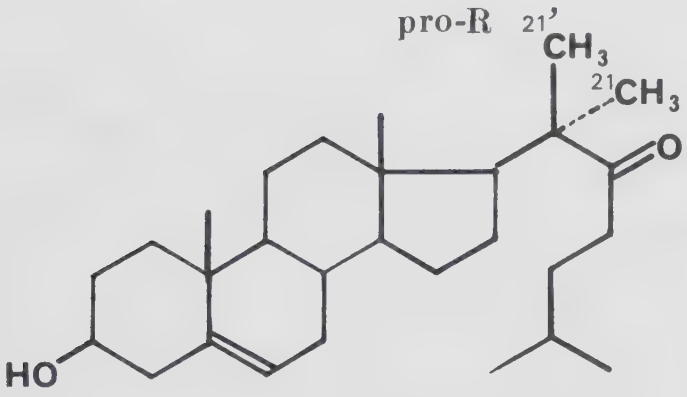
La présence d'un méthyle supplémentaire en 20 est mise en évidence par le spectre de RMN, signalant deux pics méthyle à 1,12 et 1,16 ppm, et par la fragmentation de la liaison 20-22, en spectrométrie de masse : m/e = 315 ($M-C_6H_{11}O$).

Remarque :

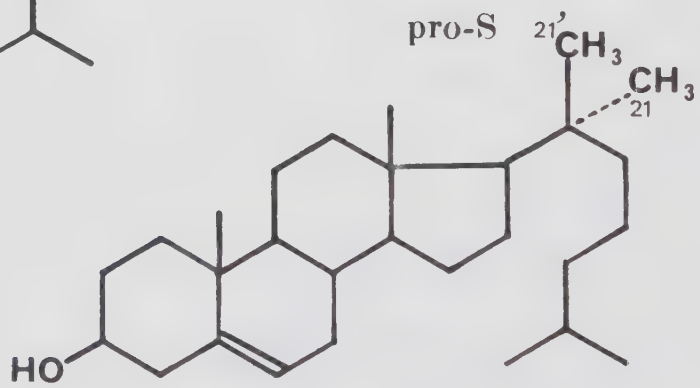
Nous avons pris la convention suivante pour nommer les deux méthyles en 20 :

- le carbone du méthyle en arrière du plan, sera appelé 21,

- le carbone du méthyle en avant du plan, sera appelé 21'.



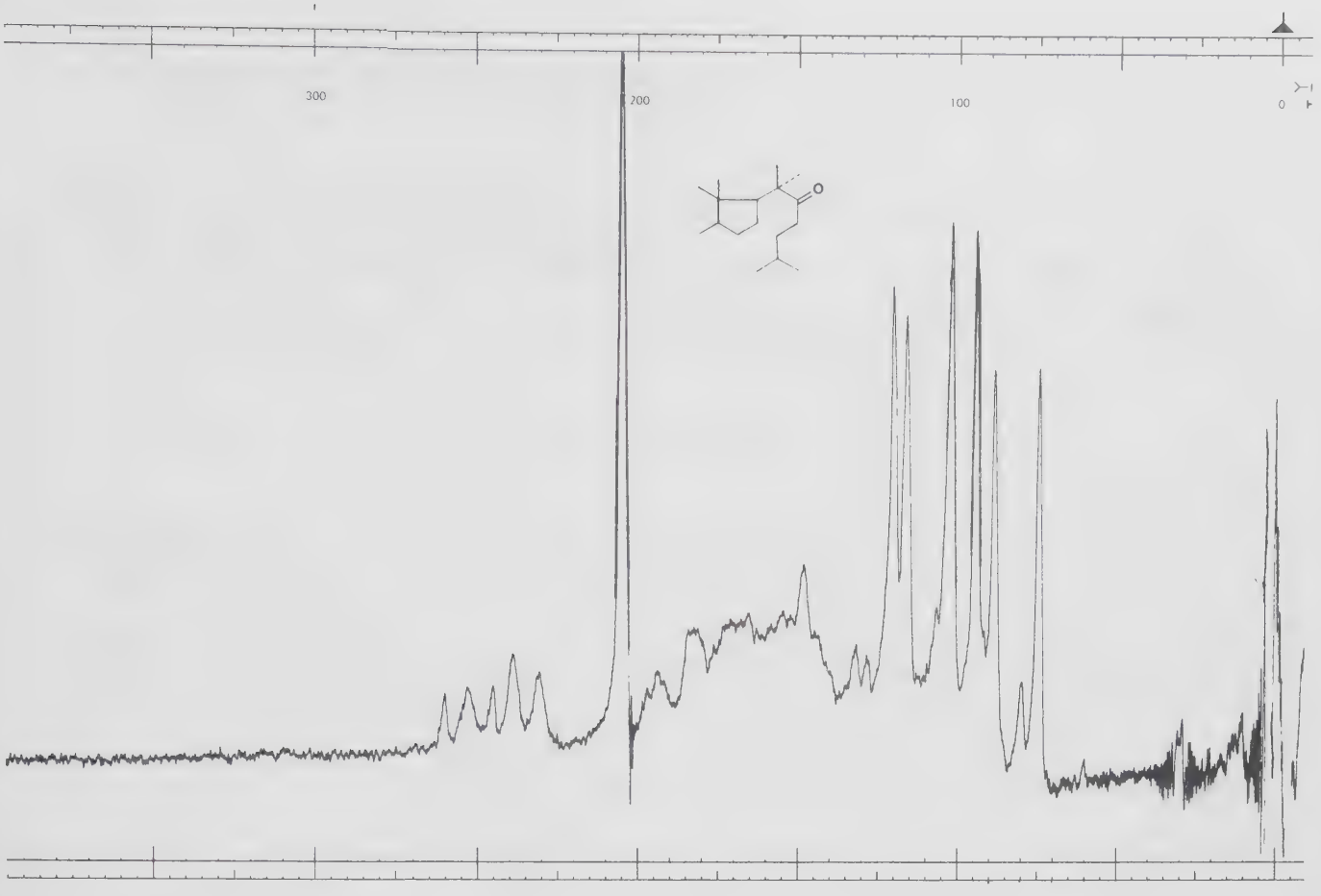
45

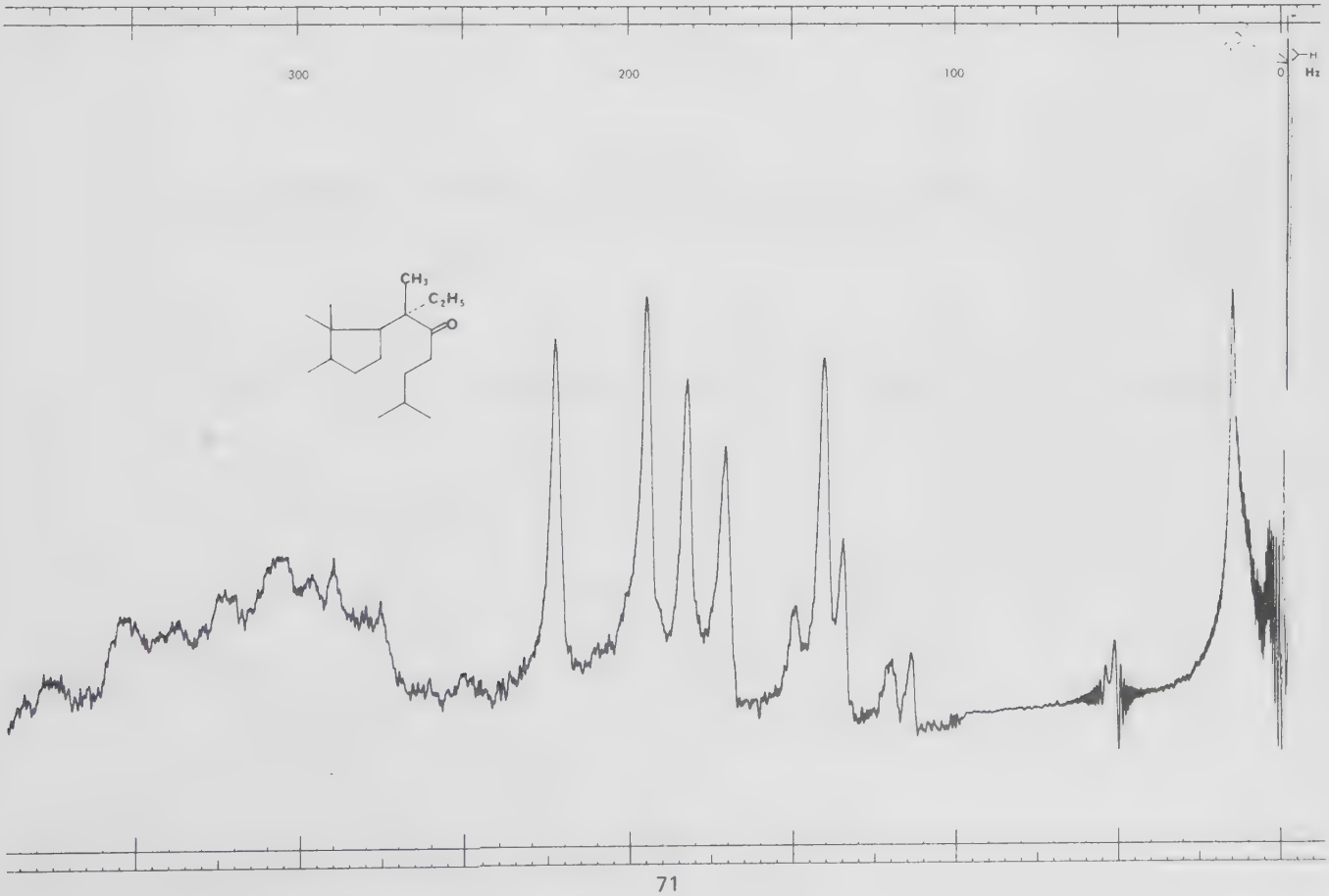


39

La méthylation en C-20 est stéréosélective.

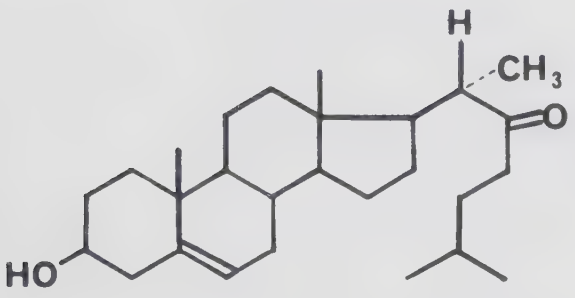
En effet, le produit obtenu par addition d'un éthyle, au lieu d'un méthyle, comporte dans son spectre de RMN, un seul pic méthyle à 1,12 ppm.


300
200
100
0
O

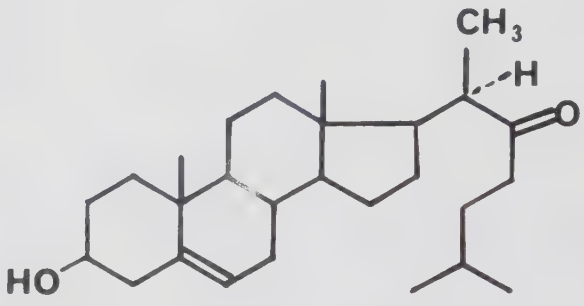

300
200
100
0
Hz
CH3
C2H5
O

Les pics RMN CH_3-21 et CH_3-21', ont été attribués pour les raisons suivantes :

- le doublet du méthyle 21 du (20S) céto-22 cholestérol **47** , est situé vers les champs faibles (1,09 ppm), par rapport au méthyle 21 de l'isomère (20R) céto-22 cholestérol **48** (1,00 ppm)[42] ;



47



48

- la position en 20, très encombrée, favorise l'alkylation par la face α .

Le méthyle 21 est donc à 1,16 ppm et le méthyle 21' à 1,12 ppm.

3° Obtention du méthyl-20 cholestérol 39

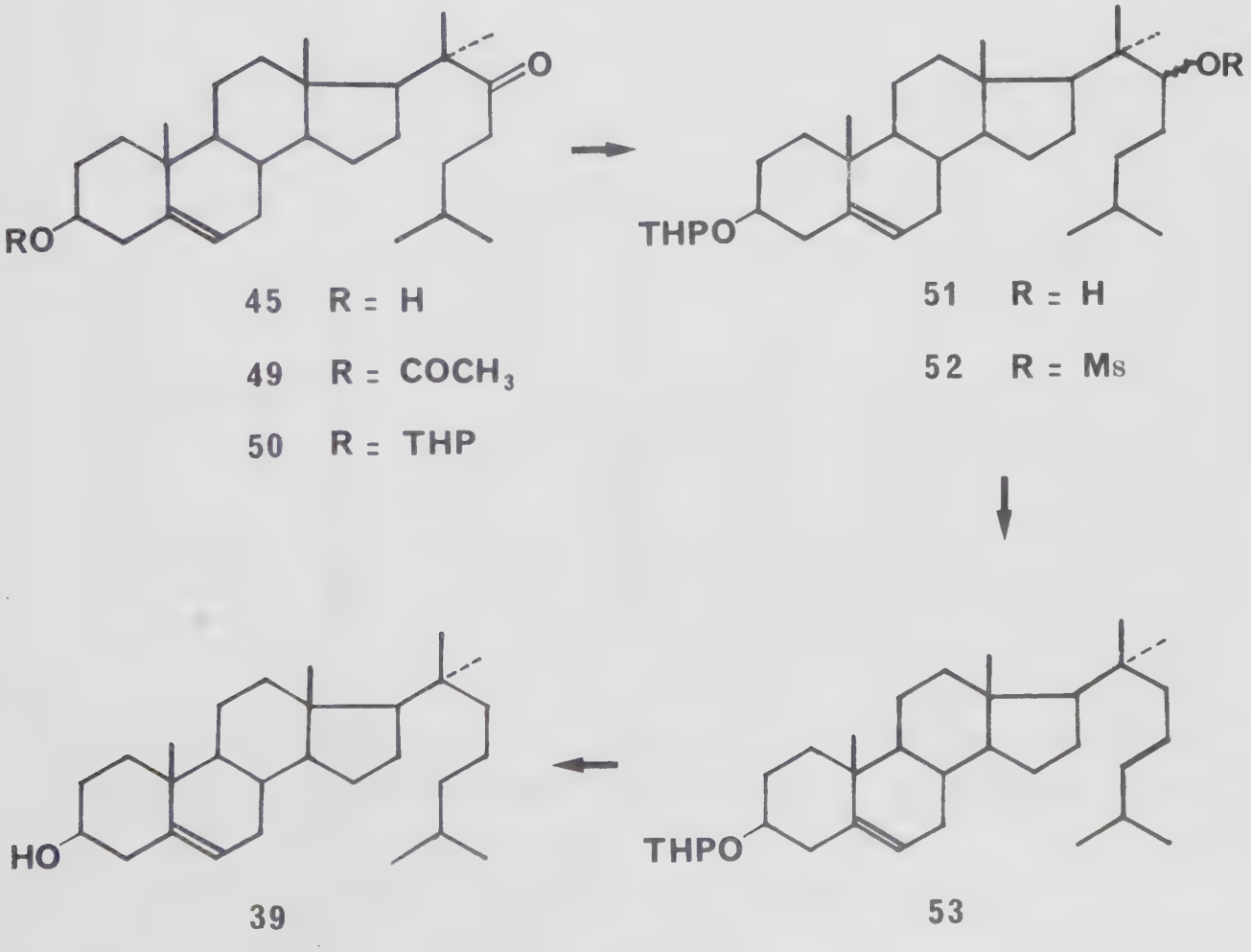
La fonction alcool en 3β de **45** est au préalable, protégée par un groupement tétrahydropyrannyle **50** .

La fonction cétone en 22 est réduite par $LiAlH_4$.

Les alcools épimères en 22 **51** obtenus, sont mésylés.

Les esters **52** sont alors déplacés par l'hydrure de $LiAlH_4$, pour obtenir le tétrahydropyrannyloxy-3β méthyl-20 cholestérol **53** .

Par hydrolyse acide, on obtient finalement le méthyl-20 cholestérol **39**.



45 R = H

49 R = $COCH_3$

50 R = THP

51 R = H

52 R = Ms

39

53

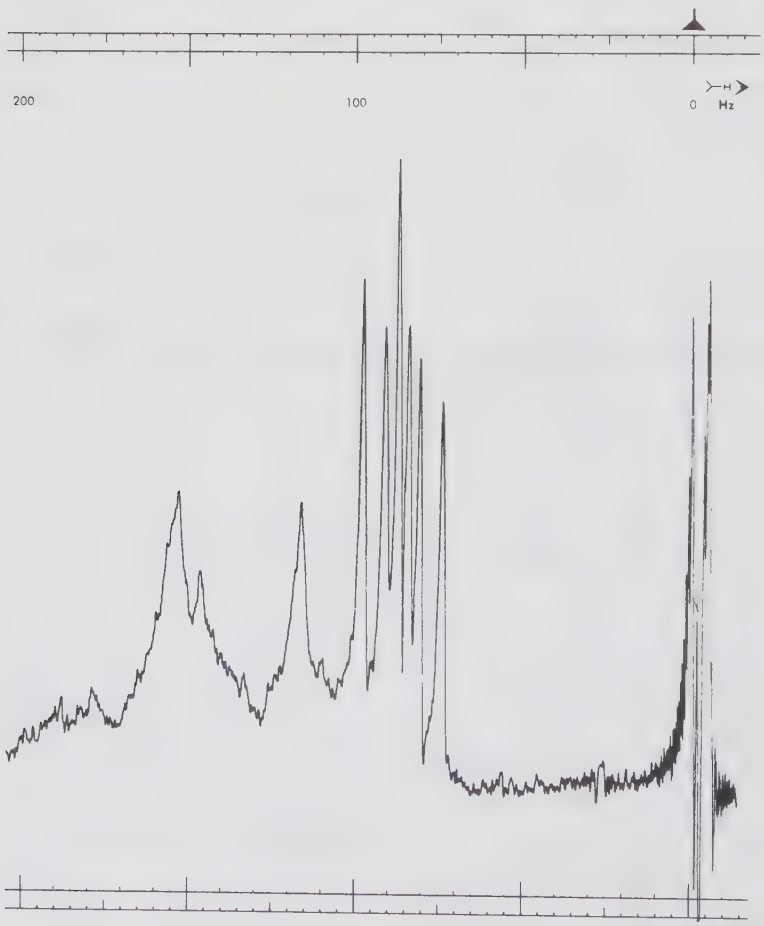
Dans le spectre RMN 100 Mz du méthyl-20 cholestérol **39** , on constate un déplacement important vers les champs faibles du méthyle 18, par rapport au cholestérol et à l'isocholestérol. Ce déplacement de 0,08 ppm est dû probablement, à une interéaction avec les méthyles 21 et 21'.

On observe en plus des pics méthyles 18 et 19, quatre pics méthyles à 0,92 ; 0,88 ; 0,85 ; 0,82 ppm.

a) Les pics 0,88 et 0,82 ppm ont été attribués au doublet de CH_3-26,27 pour les raisons suivantes :

- le doublet de CH_3-26,27 (100 MHz) est signalé également par deux pics à 0,88 et 0,82 ppm, dans le cholestérol et l'isocholestérol ;

Spectre 100 MHz du méthyl-20 cholestérol



- dans la chaîne latérale, de type cholestane, on observe une perturbation du doublet de CH_3-26,27 caractéristique [43] ; le plus grand pic du doublet étant vers les champs faibles. Nous retrouvons cette dissymétrie dans le spectre du méthyl-20 cholestérol ;

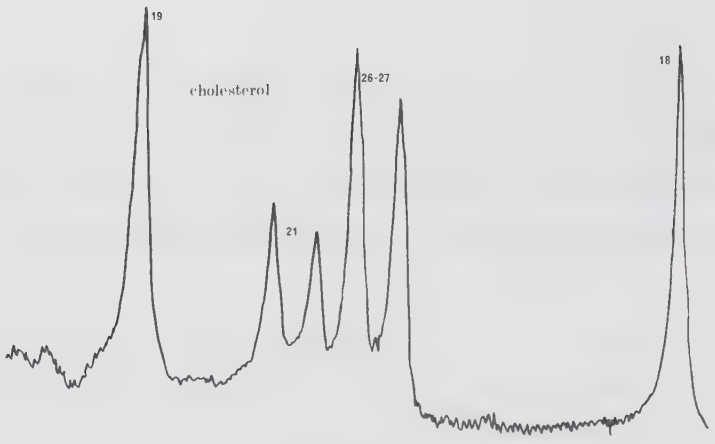
- les spectres RMN à 250 MHz du cholestérol, de l'isocholestérol et du méthyl-20 cholestérol ont été également comparés :

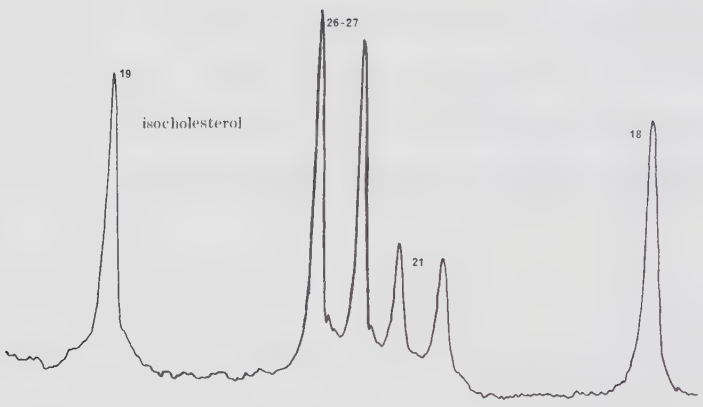
  . les pics du doublet de CH_3-26,27 (J = 7 Hz) de ces trois composés présentent une dissymétrie nettement moins accentuée que dans les spectres à 100 MHz,

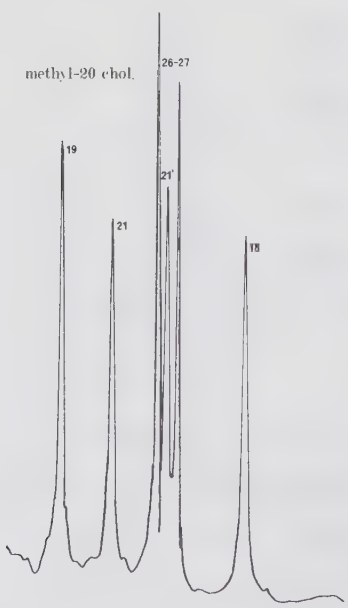
  . par rapport au spectre à 100 MHz, seul le pic vers les champs forts du doublet de CH_3-26,27 est déplacé dans le spectre à 250 MHz ;

RMN	d (J = 6-7 Hz) de CH_3-26,27		
	cholestérol	isocholestérol	méthyl-20 cholestérol
100 MHz	0,88	0,88	0,88
	0,82	0,82	0,82
250 MHz	0,88	0,89	0,89
	0,85	0,86	0,86

- un effet à longue distance est observé sur ce doublet par les substituants en C-22 (C=O ; C-OH ; C-NH_2), provoquant un déplacement vers les champs faibles de 0,04 - 0,05 ppm.

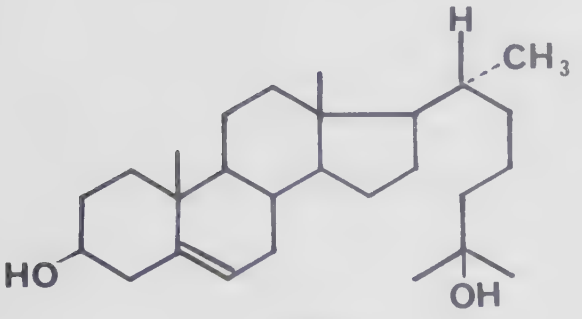

19
cholesterol
26-27
18
21


26-27
19
isocholesterol
18
21

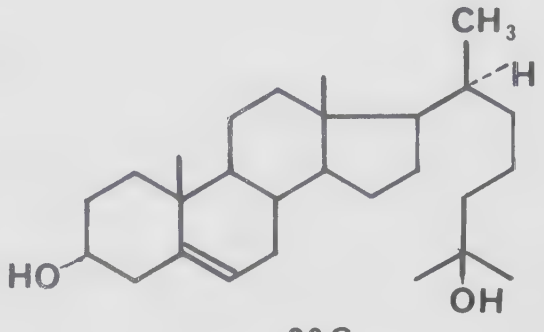

methyl-20 chol.
26-27
19
21'
21
18

b) Les pics 0,92 et 0,85 ont été attribués respectivement aux méthyles 21 et 21', après comparaison des positions des méthyles en C-20 :

- des composés (20R) hydroxy-25 cholestérol (0,93 ppm) et (20S) hydroxy-25 cholestérol (0,84 ppm) à 100 MHz [44] :

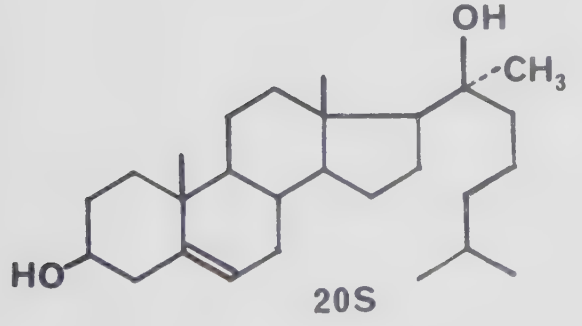


20R

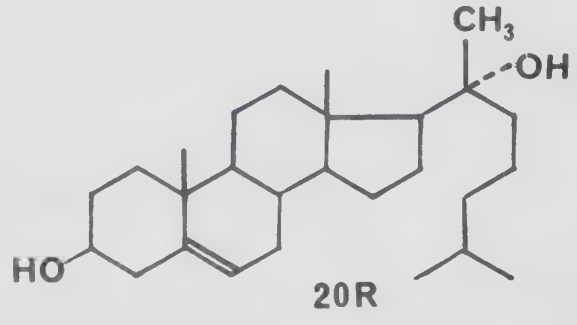


20S

- des composés hydroxy-(20S) cholestérol (1,28 ppm) et hydroxy-(20R) cholestérol (1,12 ppm) à 100 MHz [30] :

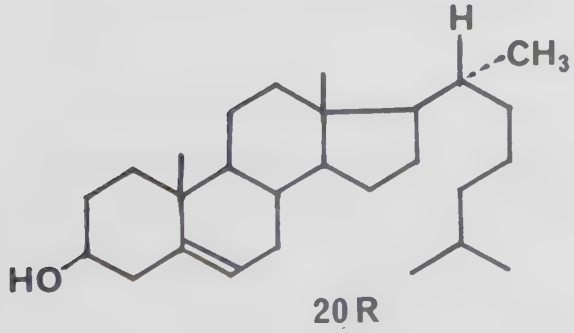


20S

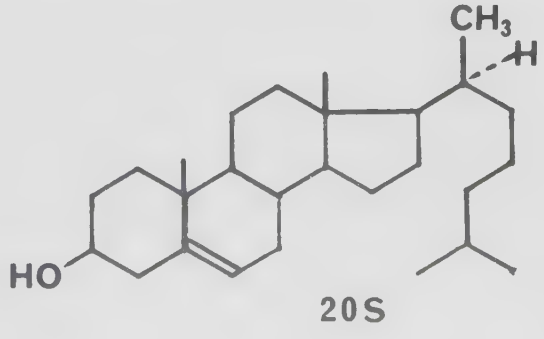


20R

- du cholestérol (0,93 ppm) et de l'isocholestérol (0,83 ppm) à 250 MHz :



20R



20S

Le méthyle en arrière du plan (CH_3-21) est comme dans le cas des composés céto-22, toujours dans les champs faibles, par rapport au méthyle en avant du plan (CH_3-21').

CHAPITRE III

TESTS BIOLOGIQUES

Ainsi qu'il a été exposé dans les chapitres précédents, quatre produits ont été synthétisés :

- amino-(22R) cholestérol,10
- amino-(22S) cholestérol,11
- oximo-22 cholestérol,18
- méthyl-20 cholestérol39

Il importait de les étudier sur le plan biologique, en vue :

- d'une part, d'étudier leur interférence dans le métabolisme du cholestérol ;

- d'autre part, d'en tirer toute conclusion pour la compréhension des mécanismes biologiques, et la recherche éventuelle, d'autres composés ayant d'autres formes d'action.

Les expériences n'ont porté, jusqu'ici, que sur les 3 premiers produits cités. D'autres expériences sont actuellement en cours sur le quatrième (méthyl-20 cholestérol), mais les résultats complets n'en sont pas encore connus.

Nous avons de même été amenés, pour des raisons pratiques, à concentrer les expériences in vivo, sur l'amino-22R qui, en première analyse, semblait être le plus prometteur.

Les expériences biologiques ont été réalisées in vitro et in vivo, sur les bases suivantes :

- in vitro, en étudiant d'une part, la biosynthèse du cholestérol à partir de précurseurs marqués, d'autre part, la biodégradation du cholestérol en prégnénolone dans le cortex des surrénales ;

- in vivo, en étudiant sur des rats Wistar, l'action de l'amino-(22R) sur la biosynthèse du cholestérol et des acides gras, et la biodégradation en acides biliaires.

Ces deux points seront examinés successivement.

I EXPERIENCES IN VITRO

A/ BIOSYNTHESE DU CHOLESTEROL

Les précurseurs marqués suivants : acétate, mévalonate, et desmostérol, ont été incubés dans des homogénats de foie de rats, en présence de concentrations variables d'inhibiteurs, selon la méthode de M.N. CAYEN et D. DVORNIK [45] .

1° Amino-(22R) et (22S) cholestérol :

Initialement, les 2 composés ont été incubés à une concentration de 1×10^{-4}M, simultanément avec le $\left[2-{}^{14}C\right]$ acétate et le $\left[{}^{3}H\right]$ mévalonate, et les résultats suivants ont été obtenus :

Composés	changement dans le % d'incorporation à partir de	
	$\left[{}^{14}C\right]$ acétate	$\left[{}^{3}H\right]$ mévalonate
Amino-(22S) cholestérol	-100	-100
Amino-(22R) cholestérol	- 89	- 80

Ces chiffres montrent que le lieu d'inhibition est situé après la formation d'acide mévalonique.

Dans une deuxième expérience, les composés ont été incubés à différentes concentrations, simultanément, avec le $[^{14}C]$ desmostérol et le $[^{3}H]$ mévalonate et les résultats suivants ont été obtenus :

Composés	Concentration	changement dans le % d'incorporation, à partir du	
		$[^{3}H]$ mévalonate	$[^{14}C]$ desmostérol
Amino-(22S)	1×10^{-4}	- 100	- 81
	1×10^{-5}	- 70	- 61
	1×10^{-6}	+ 6	- 35
Amino-(22R)	1×10^{-4}	- 89	- 74
	1×10^{-5}	+ 6	- 7
	1×10^{-6}	+ 13	+ 30

Le cholestérol a été isolé, cristallisé et purifié sous la forme du dérivé dibromo-5,6. Cette étude a montré que le lieu d'inhibition est entre le desmostérol et le cholestérol (comme, par exemple, pour le triparanol).

L'amino-(22S) cholestérol est actif à la concentration de 10^{-5}M et l'amino-(22R) cholestérol n'est actif qu'à 10^{-4}M.

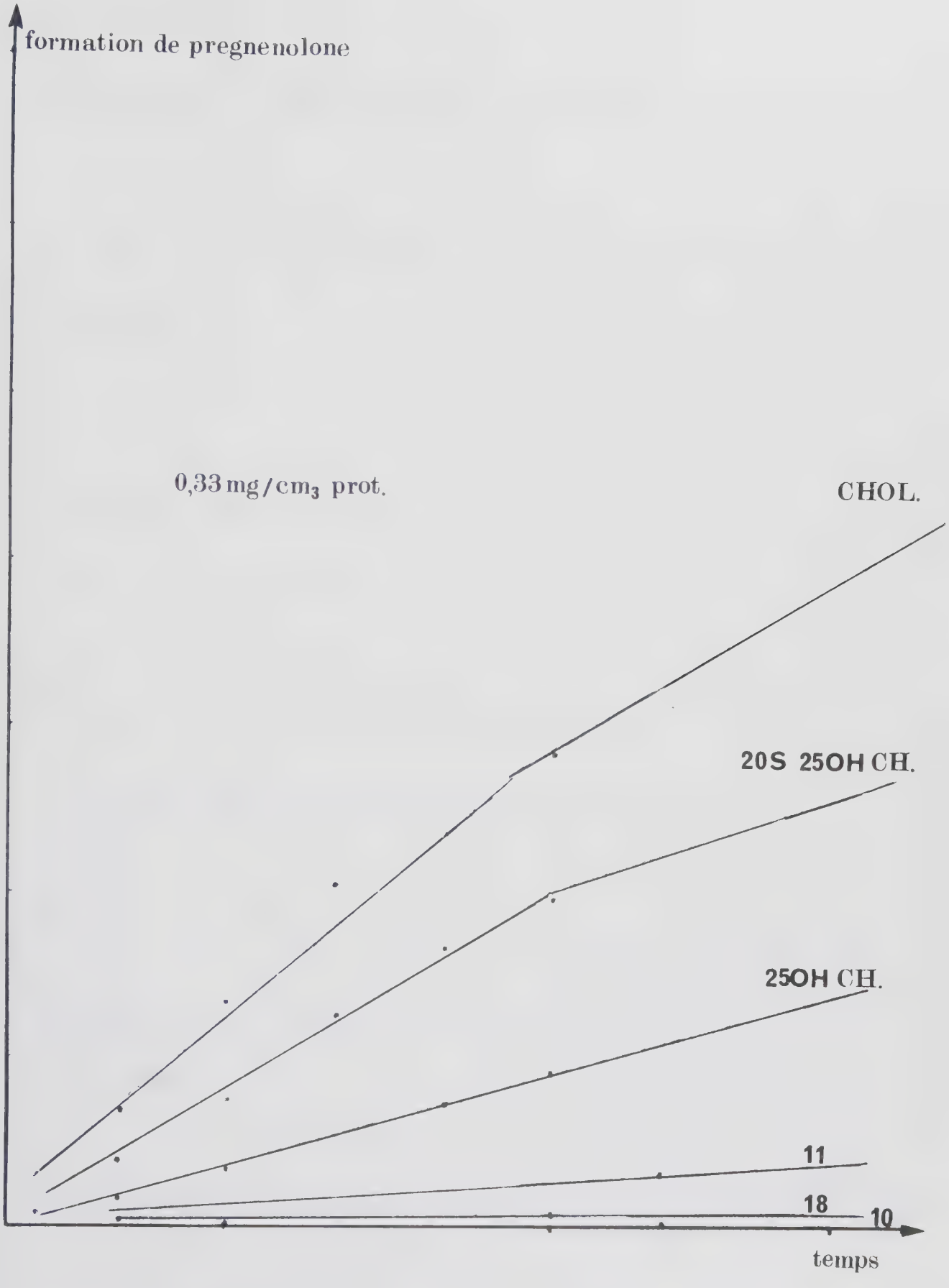
La constatation que l'inhibition est localisée après le desmostérol semble peu favorable en vue d'un usage thérapeutique ; mais, ainsi que nous le verrons plus loin, les essais in vivo, avec l'amino-(22R) cholestérol, feront suggérer un mode d'action différent sur la biosynthèse du cholestérol.

2° Oximo-22 cholestérol

L'oximo-22 cholestérol a été incubé à différentes concentrations, simultanément avec le $[^{14}C]$ acétate et le $[^{3}H]$ mévalonate :

Concentration	changement dans le % d'incorporation à partir de			
	(lipides non saponifiables)		(cholestérol)	
	Acétate	Mévalonate	Acétate	Mévalonate
1×10^{-4}	- 3	+ 19	- 99	- 95
1×10^{-5}	+ 4	+ 10	- 77	- 66
1×10^{-6}	+ 7	+ 2	- 20	- 10

Ces dosages pour l'inhibition du cholestérol montrent que l'oxime est un inhibiteur actif à 1×10^{-5}. D'après ces résultats, on peut déduire que le lieu d'inhibition se situe après la formation de squalène.


formation de pregnenolone
0,33 mg/cm3 prot.
CHOL.
20S 25OH CH.
25OH CH.
11
18
10
temps

B/ BIODEGRADATION DU CHOLESTEROL DANS LES SURRENALES

Le but recherché était l'étude de l'influence de ces trois produits, dans la transformation du cholestérol en prégnénolone, dans le cortex des surrénales.

La préparation des surrénales a été effectuée selon la technique de M. GUT et S. BURSTEIN [46] .

La concentration du cholestérol, dans toutes les expériences, est de 17,3 μM. Les inhibiteurs sont ajoutés à une concentration équimoléculaire. La concentration en protéine est de 0,33 mg/cm3. Les incubations sont faites à 37°.

Inhibition cholestérol ⟶ prégnénolone dans le cortex des surrénales				
Inhibiteurs	% d'inhibition			
Blanc	0	0	0	0
Desmostérol		44	55	
(20S)-desmostérol	90	55	77	
Hydroxy-25 cholestérol				66
(20S) hydroxy-25 cholestérol	80	77		30
Amino-(22R) cholestérol	97	100		
Amino-(22S) cholestérol	80	87		
Oximo-22 cholestérol				> 98

II EXPERIENCES IN VIVO [47]

Ces expériences ont été réalisées sur des rats Wistar, soumis pendant 7 jours, à un régime comprenant 0,3 % en poids, d'amino-22 cholestérol[10]

Les analyses avaient pour but, d'étudier l'action de ce composé sur :

- la biosynthèse,
    - . du cholestérol,
    - . des acides biliaires,

- le taux de cholestérol sanguin,

- la biodégradation du cholestérol en acides biliaires,
    - . hydroxylation en H-7α ,
    - . décarboxylation en C-26.

Le tableau suivant, résume les résultats obtenus :

INFLUENCE DE L'AMINO-(22R) CHOLESTEROL DANS LE METABOLISME DES LIPIDES

SUR LES RATS WISTAR

METABOLISME DU CHOLESTEROL	TEST	CONTROLE
Nombre	4/4	4/4
Gain de poids (g)	-2±6	47±1
Poids du foie (g)	5,3±0,4	8,6±0,7
Foie en %/poids du corps	3,21±0,02	4,00±0,36
Cholestérol sérique (mg/100 cm3)	151±12	122±11
Cholestérol dans le foie (mg/100 g)	259±6	258±17
Oxydation du [^{14}C-26] cholestérol (%/mgN)		
+ cytosol	12,3±0,9	9,8±2,2
- cytosol	3,9±1,4	3,0±1,1
Hydroxy-7 α cholestérol (pmoles/mg/min)	24,73±0,96	43,47±3,75
Biosynthèse à partir de [^{14}C-1] acétate (cpm/mg cholestérol)	494±39	677±46
METABOLISME DES ACIDES GRAS		
Biosynthèse à partir de [^{14}C-1] acétate (cpm/0,5 g de foie)	3747	15366

Le poids du corps est nettement influencé même à la dose de 0,3 % dans le régime. Il faut toutefois remarquer que le poids du foie diminue dans les mêmes proportions que le poids du corps.

L'amino-(22R) ne semble pas influencé, de façon significative, le taux de cholestérol sérique, et le taux de cholestérol dans le foie.

L'oxydation du [^{14}C-26] cholestérol en $^{14}CO_2$, dans les mitochondries du foie de rats, est d'environ 30 % supérieure, dans les rats traités. L'augmentation de l'oxydation a été observée aussi bien avec que sans cytosol. La diminution de l'oxydation sans cytosol, est une constatation largement observée, dans des expériences semblables.[48]

L'hydroxylation en 7α du cholestérol, dans les microsomes, première étape de la synthèse des acides biliaires, est réduite de 43 %. Il faut remarquer qu'actuellement, aucune substance connue, possède la propriété d'inhiber aussi fortement cette réaction.

On observe également, une diminution significative (27 %) de la biosynthèse du cholestérol dans le foie. L'analyse du sérum et des extraits de foie, avec la chromatographie gazeuse, n'a montré aucune accumulation de stéroïdes, comme dans le cas des azastéroïdes (desmostérol). Le site d'inhibition se situe donc avant le squalène, ce qui est en contradiction avec l'observation faite in vitro.

Pour la conversion de [^{14}C-1] acétate en acides gras, l'inhibition est encore plus remarquable (76 %).

En conclusion, l'amino-22R cholestérol, donné à la dose de 0,3 %, dans la nourriture, pendant 7 jours, à des rats Wistar, n'influence que faiblement le taux de cholestérol dans le sang et dans le foie. Il provoque, cependant, deux inhibitions remarquables, dans la biosynthèse des acides gras (76 %) et dans l'hydroxylation du cholestérol (43 %).

PARTIE EXPERIMENTALE

- Les points de fusion non corrigés, sont pris en tubes capillaires avec un appareil de W. BUCHI.

- Les mesures de pouvoirs rotatoires ont été effectuées avec le polarimètre électronique de PERKIN-ELMER, type 141 MC, pour la raie D du sodium, à la température moyenne de 20°C. Les valeurs de α_D, indiquées, correspondent à des solutions chloroformiques.

- Les spectres de RMN du 'H ont été réalisés sur des spectrographes VARIAN A-60 et VARIAN HA 1000 D 15 ; les spectres de RMN du ^{13}C sur BRUKER HXE 90, (en solution dans le chloroforme deutérié, sauf exception signalée) ; le tétraméthylsilane étant pris comme zéro de référence, les déplacements chimiques (δ) sont évalués en ppm, les constantes de couplage en Hertz.

- Les spectres de masse ont été enregistrés sur spectrographes Atlas CH4 ou AEI MS 9.

- Les spectres U.V ont été enregistrés en solution méthanolique, avec un spectrophotomètre CARY 11 MS.

- Les microanalyses ont été effectuées par SCHWARZKOPF Microanalytical Laboratory, Woodside, N.Y.

Les chromatographies sur plaque ont été réalisées à l'aide de silice KIESELGEL G MERCK, neutre.

Les abréviations utilisées dans le texte sont :

C.C.M : chromatographie en couche mince ;

C.P.P. : chromatographie sur plaque préparative ;

en RMN : s : singulet, d : doublet, t : triplet, d de d : doublet dédoublé, m : multiplet, q : quadruplet ;

S.M : spectre de masse ;

I.R : spectre infra-rouge ;

U.V : spectre ultra-violet.

2 Hydroxy-3 β cholestène-5 one-22

Dans un tricol, sous courant d'azote, contenant 2 g de tournures de magnésium, on ajoute une solution de 13 g de bromure d'isopentyle, dans 200 cm3 d'éther anhydre, sous agitation. On ajoute alors au magnésien ainsi formé, une solution de 2 g de l'ester méthylique de l'acide bisnor 23-24 cholénique **1** , dans 650 cm3 de benzène anhydre. Le mélange est alors porté à reflux, pendant la nuit.

Le réactif en excès est décomposé lentement, par une solution saturée de chlorure d'ammonium. Après l'extraction habituelle au benzène, on obtient 2 g de résidu huileux.

Par élution avec 5 % d'acétate d'éthyle dans le benzène, sur colonne de silicagel, on obtient 1,90 g de cétone **2** , qui par recristallisation de l'acétone donne :

F = 142°-143°

α_D : -54° (C=1)

I.R : ν(OH) à 3 500 cm^{-1} ; ν(C=O) à 1 700 cm^{-1}

RMN : s à 0,70 (CH_3-18) ; s à 1,01 (CH_3-19) ; d (J=7Hz) à 1,09 (CH_3-21) ; d (J=5,5Hz) à 0,89 (CH_3-26,27)

S.M : 400 = M^+ (47 %) ; 385 = M^+-15 (14 %) ; 382 = M^+-18 (19 %) ; 344 = $M^+-C_4H_8$ (10 %° ; 99 = $C_6H_{11}O$ (100 %)

3 Benzoyloxy-3β cholestène-5 one-22

Un mélange de céto-22 cholestérol 2 (1,72 g), de chlorure de benzoyle (1,3 cm3) et de pyridine (2 cm3), est porté à 60°, pendant 1 heure, puis abandonné, pendant une nuit, à température ambiante.

Après précipitation sur la glace et lavage abondant à l'eau, le précipité obtenu est dissous dans le chlorure de méthylène et extrait de la manière habituelle.

Par recristallisation de l'acétone on obtient :

F = 178°-179°

I.R : ν(C=O) à 1 700 cm^{-1}

RMN : s à 0,70 (CH_3-18) ; s à 1,00 (CH_3-19) ; d (J=7Hz) à 1,09 (CH_3-21) ; d (J=6Hz) à 0,89 (CH_3-26,27)

S.M : 382 = $M-C_6H_5COOH$; 367 = $M-C_6H_5COOH$-15 ; 326 = $M-C_6H_5COOH-C_4H_8$; 105 = C_6H_5CO ; 99 = $C_6H_{11}O$

Benzoyloxy-3β cholestène-5 ol-(22R) et (22S)

Dans une solution de 2,166 g de **3** , dans 30 cm3 de THF et 15 cm3 de méthanol, sont ajoutés progressivement 2 g de borohydrure de sodium. La solution est agitée, pendant deux jours.

Après addition d'eau, on extrait au chlorure de méthylène, de la manière habituelle.

La séparation des deux alcools épimères en 22 s'effectue sur C.P.P., par 3 migrations successives avec le benzène comme éluant. Après séparation on obtient :

5 Benzoyloxy-3β cholestène-5 ol-(22R) 320 mg (25 %)

qui, par 2 recristallisations de l'acétone donne :

F = 187°

α_D : -15° (C=1)

S.M : 384 = M-C_6H_5COOH (100 %) ; 284 (7 %) ; 105 = C_6H_5CO (37 %)

4 Benzoyloxy-3β cholestène-5 ol-(22S) 932 mg (75 %)

qui donne, après 2 recristallisations de l'acétate d'éthyle :

F = 162°

α_D : -25° (C=1)

S.M : très voisin du spectre de (22R)OH

Hydroxy-22 cholestérol par réduction de 2 avec le Li/Ethylamine

A une solution de 100 mg de céto-22 cholestérol 2 dans 10 cm3 d'éthylamine, on ajoute, par petits morceaux, 100 mg de lithium. La solution de couleur bleue est agitée pendant 2 heures.

On arrête la réaction par quelques gouttes d'une solution saturée de chlorure d'ammonium. L'extraction se fait au chlorure de méthylène, de la manière habituelle.

La séparation des 2 épimères alcool en 22, s'effectue sur des plaques préparatives de silice, contenant 15 % en poids de nitrate d'argent. On obtient :

Hydroxy-(22R) cholestérol (60 %)

qui, recristallisé du mélange éther-méthanol, donne :

F = 187°-188°

α_D : -38° (C=1)

I.R : 1 020 cm^{-1} caractéristique de (22R)OH

RMN : s à 0,71 (CH_3-18) ; s à 1,01 (CH_3-19) ; d (J=5,5Hz) à 0,91 (CH_3-26,27) ; m à 5,4 (H-6)

S.M : 402 = M (59 %) ; 384 = M-H_2O (29 %) ; 351 = M-$2H_2O$ (16 %) ; 302 = M-$C_6H_{12}O$ (52 %) ; 83 (82 %) ; 55 (100 %)

Hydroxy-(22S) cholestérol (40 %)

qui, recristallisé du méthanol, donne :

F = 181°-182°

α_D : -54° (C=1)

I.R : 985 cm^{-1} caractéristique de (22S)OH

RMN : s à 0,70 (CH_3-18) ; s à 1,01 (CH_3-19) ; d (J=5,5Hz) à 0,91 (CH_3-26,27) ; m à 5,4 (H-6)

6 Benzoyloxy-3β tosyloxy (22S) cholestène-5

On dissout 200 mg d'ester-alcool **4** dans 3 cm3 de pyridine ; on y ajoute 100 mg de chlorure de tosyle et le mélange est laissé à la température ambiante, pendant 4 jours.

Après dilution à l'eau, le tosylate **6** est extrait au chlorure de méthylène. On obtient 250 mg de produit brut, qui est désséché sur P_2O_5.

8 Benzoyloxy-3β azido-(22R) cholestène-5

A un mélange de N_3Na (1 g) dans l'HMPT fraîchement distillé (30 cm3), on introduit les 250 mg de tosyloxy (22S) **6** . Le mélange réactionnel est agité pendant 3 heures, à la température ambiante. On dilue à l'eau et on extrait au benzène. Après évaporation sous vide, du solvant, on obtient 195 mg de produit brut cristallisé (F = 174°).

Pour l'analyse l'azide est recristallisé deux fois de l'acétone. On obtient 95 mg ayant les propriétés suivantes :

F = 178°-179°

α_D : +6° (C=1)

I.R : ν(N3) à 2 084 cm^{-1} ; ν(C=O) à 1 720 cm^{-1}

RMN : s à 0,73 (CH_3-18) ; s à 1,01 (CH_3-19) ; d (J=7Hz) à 0,95 (CH_3-21) ; d (J=5,5Hz) à 0,91 (CH_3-26,27)

S.M : 460 = M-C_5H_{11} (4 %) ; 432 = M-C_5H_{11}-N_2 (14 %) ; 409 = M-C_6H_5COOH (100 %) ; 283 = M-C_6H_5COOH-$C_6H_{12}N_3$ (11 %) ; 98 = $C_6H_{12}N$ (81 %)

Analyse : $C_{34}H_{49}O_2N_3$: calc. % N 7,90

tr % 7,64

10 Amino-(22R) cholestérol

A une solution éthérée (6 cm3) d'azide 8 (86 mg), on ajoute 60 mg de $LiAlH_4$. On chauffe à reflux, pendant 2 heures.

Après extraction on récupère 71 mg d'amine brute, qui cristallisé du mélange hexane/éther, donne :

F = 141°-142°

α_D : -37° (C=1)

RMN : s à 0,70 (CH_3-18) ; s à 1,01 (CH_3-19) ; d (J=5,5Hz) à 0,89 (CH_3-26,27)

S.M : 401 = M^+ (traces) ; 100 = $C_6H_{12}NH_2$ (pic de base)

Analyse : $C_{27}H_{47}ON$: calc. % C 80,73 H 11,80 N 3,49

tr % 80,43 11,80 3,27

10b N-benzoylamido-(22R) cholestérol

L'amine-22R (50 mg) est dissoute dans une solution (4 cm3), de benzène /chlorure de méthylène (1/1). On y ajoute une solution aqueuse de soude à 5 % (15 cm3). Le mélange est agité pendant 1 heure, en présence de chlorure de benzoyle.

L'extraction au chlorure de méthylène fournit 60 mg d'amide, qui, cristallisé du mélange (benzène, acétate d'éthyle), donne :

F = 214°-215°

α_D : -25° (C=1)

RMN : s à 0,70 (CH_3-18) ; s à 1,00 (CH_3-19) ; d (J=7Hz) à 0,92 (CH_3-21) ; d (J=5,5Hz) à 0,88 (CH_3-26.27)

S.M : très voisin du spectre de l'épimère (22S)

10a N-acétylamido-(22R) cholestérol

On dissout 70 mg d'amino-(22R) dans 5 cm3 de méthanol. On ajoute quelques gouttes d'anhydride acétique.

L'amide obtenu, cristallisé du méthanol donne :

F = 215°-216°

α_D : -31° (C=1)

RMN : s à 0,68 (CH_3-18) ; s à 1,02 (CH_3-19) ; d (J=5,5Hz) à 0,88 (CH_3-26,27)

S.M : très voisin du spectre de l'épimère**11a**

7 Benzoyloxy-3 β tosyloxy-(22R) cholestérol

Une solution de 120 mg de (22R)OH 5 de 100 mg de chlorure de tosyle, dans 2 cm3 de pyridine, est agitée pendant 3 jours.

On obtient, après extraction de la manière habituelle 144 mg de 7 .

9 Benzoyloxy-3 β azido-(22S) cholestène-5

L'azidolyse est réalisée dans les mêmes conditions que pour l'obtention du dérivé (22R)N_3 8 .

A partir du tosyloxy(22R) 7 (144 mg), on obtient, après purification, 62 mg d'azide (22S) et 11 mg d'oléfine 9e , provenant de l'élimination du tosylate (22R) 7 .

L'azide 9 cristallise du mélange acétone-méthanol :

F = 165°-166°

α_D : -19° (C=1)

I.R : $\nu(N_3)$ à 2 084 cm^{-1} ; ν(C=O) à 1 720 cm^{-1}

RMN : s à 0,69 (CH_3-18) ; s à 1,01 (CH_3-19) ; d (J=5,5Hz) à 0,91 (CH_3-26,27)

S.M : identique au spectre de l'épimère (22R)

L'oléfine 9e donne :

RMN : 3 protons oléfiniques H_6, H_{22}, H_{23}, entre 5,20 et 5,65 ppm

S.M : 366 = M-C_6H_5COOH (100 %) ; 255 = M-C_6H_5COOH-C_8H_{15} (21 %)

11 Amino-(22S) cholestérol

Ce composé est obtenu par réduction de l'azide (22S) **9** , par $LiAlH_4$.

L'amine (22S) cristallise de l'éther de pétrole :

F = 143°-144°

α_D : -45° (C=1)

RMN : s à 0,70 (CH_3-18) ; s à 1,01 (CH_3-19) ; d (J=5,5Hz) à 0,89 (CH_3-26,27)

S.M : 100 = $C_6H_{14}N$ (100 %)

Analyse : $C_{27}H_{47}ON$: calc. % N 3,49

tr % 3,31

11b N-benzoylamido-(22S) cholestérol

L'amine (22S) **11** (50 mg) est dissoute dans 2 cm3 de benzène et 2 cm3 de chlorure de méthylène. On ajoute 15 cm3 de solution aqueuse de soude à 5 %. Le mélange est agité magnétiquement pendant 1 heure, en présence de 0,3 cm3 de chlorure de benzoyle.

L'extraction, de la manière habituelle au chlorure de méthylène donne 60 mg d'amide **11b** qui cristallise du benzène :

F = 201°-202°

α_D : -45° (C=1)

RMN : s à 0,72 (CH_3-18) ; s à 1,00 (CH_3-19) ; d (J=7Hz) à 0,99 (CH_3-21) ; d (J=5,5Hz) à 0,88 (CH_3-26,27)

S.M : 505 = M (2 %) ; 434 = M-C_5H_{11} (2 %) ; 204 = $C_6H_5CONHC_6H_{12}$ (100 %) ; 105 = C_6H_5CO (7 %)

11a N-acétylamido-(22S) cholestérol

L'amine-alcool **11** est dissous dans le minimum de méthanol. On ajoute quelques gouttes d'anhydride acétique (léger excès). L'amide obtenu cristallise du méthanol.

On obtient un premier jet de 52 mg :

F = 255°-256°

α_D : -48° (C=0,6)

RMN : s à 0,70 (CH_3-18) ; s à 1,02 (CH_3-19) ; d (J=5,5Hz) à 0,88 (CH_3-26,27)

S.M : 443 = M^+ (0,5 %) ; 372 = M-C_5H_{11} (0,5 %) ; 142 = $CH_3CONHC_6H_{12}$ (100 %) ; 100 (36 %)

15 Acétoxy-3β cholestène-5 ol-(22S)

A une solution de 2 g de cétone-22 **14** , dissous dans 100 cm3 de THF fraîchement distillé, on ajoute 2 g de LiAl $(O\text{-}tBu)_3H$. La solution est agitée pendant 24 heures.

Après addition d'une solution diluée d'acide chlorhydrique, on extrait au chlorure de méthylène. La phase organique est lavée à l'eau, puis par une solution de bicarbonate de sodium, séchée et évaporée sous vide.

Le résidu cristallise de l'acétate d'éthyle, en donnant 1,5 g (75 %) :

F = 162°-163°

RMN : s à 0,68 (CH_3-18) ; s à 1,00 (CH_3-19) ; d (J=5,5Hz) à 0,88 (CH_3-26,27) ; s à 2,01 (CH_3CO-)

L'ester-alcool est acétylé pour donner, après recristallisation dans le méthanol le diester :

F = 145°-146°

α_D : -60°

17 Acétoxy-3β azido-(22R) cholestène-5

Même mode opératoire que pour l'obtention du (22R) benzoyloxy-3β azido-22 cholestène-5 **8** .

Après tosylation de l'alcool (22S) **15** et traitement par l'azide de sodium, on obtient après cristallisation du méthanol :

F = 89°-90°

I.R : $\nu(N_3)$ à 2 090 cm^{-1} ; $\nu(C=O)$ à 1 720 cm^{-1}

RMN : s à 0,72 (CH_3-18) ; s à 1,02 (CH_3-19) ; d (J=7Hz) à 0,94 (CH_3-21) ; d (J=5Hz) à 0,91 (CH_3-26,27) ; s à 2,00 (CH_3CO-)

S.M : 409 = M-60 (39 %) ; 370 = M-C_5H_{11}-N_2 (11 %) ; 366 = M-60-N_3H (16 %) ; 283 = M-60-$C_6H_{12}N_3$ (6 %) ; 98 = $C_6H_{12}N$ (100 %)

19 Hydrazone du céto-22 cholestérol

On chauffe à reflux une solution d'éthanol absolu (3 cm3), contenant 360 mg de cétone **2** et 1 cm3 d'hydrate d'hydrazine, pendant 48 heures.

L'extraction au chlorure de méthylène conduit à 370 mg d'hydrazone contenant un peu de produit de départ. La purification par C.P.P. fournit

209 mg d'hydrazone.

Par cristallisation de l'hexane, on obtient 135 mg de produit pur :

F = 144°-146°

α_D : -68° (C=1,6)

RMN : s à 0,72 (CH_3-18) ; s à 1,01 (CH_3-19) ; d (J=7Hz) à 1,08 (CH_3-21) ; d (J=5,5Hz) à 0,96 (CH_3-26,27)

S.M : 414 = M^+ (6 %) ; 399 = M-15 (6 %) ; 371 = M-43 (10 %) ; 358 = M-C_4H_8 (15 %) ; 343 = M-C_4H_8-15 (11 %) ; 86 = $C_4H_{10}N_2$ (100 %)

18 Oximo-22 cholestérol

A une solution de céto-22 cholestérol (1,4 g) dans 10 cm3 de pyridine, on ajoute 2 g de chlorhydrate d'hydroxylamine. On chauffe cette solution à 90°, pendant 36 heures.

Après refroidissement, l'oxime est extraite avec du chlorure de méthylène, pour donner 1,4 g de produit brut. Par C.P.P. et cristallisation de l'éthanol, on obtient 600 mg d'oxime :

F = 177°-178°

α_D : -73° (C=1)

RMN : s à 0,72 (CH_3-18) ; s à 1,01 (CH_3-19) ; d (J=7Hz) à 1,11 (CH_3-21) ; d (J=5,5Hz) à 0,92 (CH_3-26,27)

S.M : 415 = M^+ (48 %) ; 398 = M-17 (53 %) ; 372 = M-43 (56 %) ; 359 = M-C_4H_8 (22 %) ; 344 = M-C_4H_8-15 (33 %) ; 87 = C_4H_9NO (100 %)

Analyse : $C_{27}H_{45}NO_2$	: calc. %	C 78,02	H 10,91	N 3,37
	tr %	78,30	10,88	3,45

Amino-(22R) et (22S) cholestérol, par réduction de l'oxime-22 cholestérol

A/ Réduction par Li/Ethylamine

A une solution de 315 mg d'oxime-22 cholestérol dans 20 cm3 d'éthylamine, on ajoute, par portion, 200 mg de lithium. La solution, de couleur bleue, est agitée, pendant 2 heures.

L'excès de lithium est détruit par quelques gouttes de méthanol. On extrait de la manière habituelle, avec le chlorure de méthylène.

Le résidu donne 306 mg de mélange. On obtient, après séparation sur C.P.P. neutre :

10 - l'amino(22R) cholestérol, 108 mg (60 %) qui cristallise de l'hexane-éther :

F = 141°-142°

α_D : -37°

11 - l'amino (22S) cholestérol, 75 mg (40 %) qui cristallise de l'éther de pétrole :

F = 143°-144°

α_D : -45°

B/ Réduction par $AlLiH_4$/Dioxanne

Une solution d'oximo-22 cholestérol **18** (570 mg), dans le dioxanne anhydre (80 cm3), en présence de $AlLiH_4$ (500 mg), est mise à reflux, sous atmosphère d'azote, pendant 48 heures.

Après dilution à l'éther, et addition d'une solution aqueuse saturée de SO_4Na_2, la phase organique est évaporée, sous pression réduite.

La séparation du mélange des amines (22R) et (22S) s'effectue sur C.P.P. neutre, avec le méthanol comme éluant. Après 3 migrations successives, on obtient :

10 - l'amino-(22R) cholestérol (34 %)

11 - l'amino-(22S) cholestérol (66 %)

Méthylation de l'hydroxy-3β cholestadiène-5,20(22) one-23

22 (20S) acétoxy-3β vinyl-20 prégnène-5 ol-20

Dans un tricol, sous courant d'azote contenant 5 g de magnésium en tournure (0,2 at-g), on ajoute une solution de 15 cm3 de bromure de vinyle (0,2 M) dans 60 cm3 de THF anhydre. Le magnésien ainsi formé est refroidi sous agitation magnétique.

On ajoute alors, goutte à goutte, une solution de 15 g (0,04 M) dans 100 cm3 de THF. Quand l'addition est terminée on porte à reflux, pendant la nuit.

La solution est hydrolysée avec une solution saturée de chlorure d'ammonium. On extrait avec de l'acétate d'éthyle. Après lavage à l'eau, séchage sur sulfate de sodium, on obtient, après évaporation sous vide, 13,4 g (89 %) de résidu cristallisé.

Le produit brut de la réaction est acétylé avec un mélange de 40 cm3 d'anhydride acétique et 80 cm3 de pyridine, à température ambiante, pendant 24 heures.

La solution est alors précipitée dans un large excès d'eau. Le précipité cristallin est filtré, lavé à l'eau jusqu'à élimination de la pyridine, puis séché à 45°.

Une recristallisation du méthanol donne **22** :

F = 163°-164°

α_D : -67° (C=1,1)

I.R : ν(OH) à 3 500 cm^{-1} ; ν(OAc) à 1 710 et 1 250 cm^{-1} ; ν(vinyl) à 915 cm^{-1}

RMN : s à 0,86 (CH_3-18) ; s à 1,04 (CH_3-19) ; s à 1,40 (CH_3-21) ; d de d (J_{cis}=10,5H et J_{trans}=17,5Hz) à 6,05 (H-22) ; m entre 4,8 et 5,5 (3H : 2H-23 + 1H-6)

Analyse : $C_{25}H_{38}O_3$: calc. % C 77,67 H 9,91

tr % 77,87 10,12

23 (20R) acétoxy-3β vinyl-20 prégnène-5 ol-20

On rassemble les eaux-mères de **22** et après purification par C.P.P. et recristallisations successives du benzène, on obtient 1,03 g (7 %) de **23** :

F = 200°-202°

α_D : -23° (C=0,7)

I.R : semblable au spectre de l'épimère **22**

RMN : s à 0,80 (CH_3-18) ; s à 1,04 (CH_3-19) ; s à 1,24 (CH_3-21) ; d de d à 6,07 (H-22)

Analyse : $C_{25}H_{38}O_3$: calc. % C 77,67 H 9,91

tr % 77,37 9,99

22 (20S) acétoxy-3β vinyl-20 prégnène-5 ol-20

par réduction de (20S) acétoxy-3β éthynyl-20 prégnène-5 ol-20 **21**

Une solution de 500 mg de **21** dans 40 cm3 d'acétate d'éthyle est ajoutée à 100 mg de catalyseur de Lindlar. Le mélange est hydrogéné pendant 1 heure.

Après filtration sur célite et évaporation du solvant sous vide, on obtient un produit qui, par recristallisation du méthanol donne **22** :

F : 163°-164°

α_D : -65° (C=0,4)

RMN et I.R identiques à ceux de **22**

Réarrangement de **22** dans l'acide acétique et l'acide p-toluène sulfonique, à température ambiante

On dissout en chauffant légèrement 1,3 g de **22** dans 50 cm3 d'acide acétique glacial. Après addition de 17 mg d'acide p-toluène sulfonique, le mélange est agité magnétiquement, à température ambiante, pendant 3 jours.

La solution est ensuite précipitée dans 500 cm3 d'une solution 2N d'hydroxyde de sodium refroidie, puis extraite à l'éther. La phase éthérée est lavée avec une solution saturée de bicarbonate de sodium, puis d'eau, et enfin séchée sur sulfate de sodium. Après évaporation sous vide, on obtient un résidu huileux jaune.

Par chromatographie sur alumine activée (ALCOA F-20), l'élution par le benzène donne deux produits :

24 A/ le diacétoxy-3β ,23 nor-24 choladiène-5, 20 (22) **24** 700 mg (53 %) qui est recristallisé du méthanol :

F = 134°-135°

α_D : -52° (C=0,7)

I.R : ν(OAc) à 1 740 et 1 250 cm^{-1} ; ν(C=C) à 800 cm^{-1}

RMN : s à 0,57 (CH_3-18) ; s à 1,03 (CH_3-19) ; s à 1,74 (CH_3-21) ; 2 s à 2,05 et 2,07 (CH_3CO-3 et 23) ; d (J=7Hz) à 4,64 (H-23) ; m à 5,40 (H-6 et H-22)

Analyse : $C_{27}H_{40}O_4$: calc. % C 75,66 H 9,41

tr % 75,68 9,32

26 B/ le composé **26** 256 mg (20 %) qui est recristallisé du méthanol :

F = 124°-125°

α_D : -47° (C=0,7)

U.V : λ_{max} : 228 nm (ϵ = 11 500)

I.R : ν(OAc) 1 730 et 1 250 cm^{-1} ; ν(diène conjugué) 1 590 cm^{-1} ν(vinyl) à 900 cm^{-1}

RMN : s à 0,58 (CH_3-18) ; s à 1,04 (CH_3-19) ; s à 2,04 (CH_3CO-) ; d de d (J_{trans}= 17,5Hz et J_{cis}= 11Hz) à 6,44 (H-22) ; d de d (J_{trans}= 17,5Hz et J_{gem}= 1,5) à 5,34 (H_{trans}-23) ; d de d (J_{cis}= 11Hz et J_{gem}= 1,5Hz) à 5,00 (H_{cis}-23)

Analyse : $C_{25}H_{36}O_2$: calc. % C 81,47 H 9,85

tr % 81,45 9,89

Réarrangement de **22** dans l'acide acétique glacial, en présence de quantité catalytique d'acide p toluène sulfonique à 100°

Une solution de 3,40 g (8,8 mM) de **22** , dans 120 cm3 d'acide acétique glacial, contenant 42 mg (0,24 mM) d'acide p-toluène sulfonique est mis à reflux sur bain-marie, pendant 15 minutes.

Deux produits sont isolés dans le réarrangement effectué à la température ordinaire.

Par chromatographie, la séparation sur colonne d'alumine (AlCOA F-20) avec le benzène comme éluant, donne :

24 1,11 g (30 %) de **24** , qui, par recristallisation du méthanol :

F = 135°-136°

27 1,97 g (61 %) de **27** , qui, par recristallisation du méthanol, possède les propriétés physicochimiques suivantes :

F = 139°-140°

α_D : -62° (C = 0,5)

I.R : ν(C=C conjugué) à 1 580 cm^{-1} ; ν($C=CH_2$) à 910 cm^{-1} ; ν(C=C tétrasubstitué) à 1 670 cm^{-1} ;

Analyse :		C	H
calc.	%	81,47	9,85
tr	%	81,46	9,93

Réarrangement de **22** dans l'acide acétique glacial, en présence d'une quantité catalytique d'iode

Une solution de 100 cm3 d'acide acétique, contenant 400 mg de **22** et 8 mg d'iode, est chauffée sur bain de vapeur, pendant 30 minutes.

Après refroidissement, la solution est extraite comme précédemment. Après chromatographie sur alumine neutre (Woelm Grade III), on obtient **26** et **24** dans le rapport 1 : 5

Déshydratation de **22** avec l'oxychlorure de phosphore

A une solution de 400 mg de **22** dans 6 cm3 de pyridine, on ajoute, goutte à goutte 13 cm3 d'oxychlorure de phosphore, dans 7 cm3 de pyridine. Le mélange, sous atmosphère d'azote, est porté à reflux.

Après refroidissement, la solution est versée sur la glace et extraite à l'éther. La phase organique est lavée avec une solution 2N d'acide sulfurique, puis, par une solution de bicarbonate de sodium, jusqu'à pH neutre, et enfin, à l'eau.

Après séchage, sur sulfate de sodium, l'évaporation sous vide du solvant laisse 300 mg (75 %) d'un résidu cristallisé homogène sur C.C.M. qui, après recristallisation du méthanol, possède des propriétés physicochimiques identiques à **26** .

Formation de 26 à partir de 22 , par action de l'acide sulfurique dans le dioxanne

Une solution de 480 mg de 22 dans 100 cm3 de dioxanne, contenant 0,2 cm3 d'acide sulfurique est portée à reflux, pendant 1 heure. Après refroidissement, la solution est extraite à l'éther. La phase éthérée est lavée avec une solution de bicarbonate de sodium, à l'eau, puis séchée sur sulfate de sodium.

Après évaporation du solvant sous vide, le résidu obtenu est chromatographié sur colonne de silice. On obtient 345 mg (rendement : 72 %) d'un produit identique à tous points de vue, au composé 26 précédemment décrit.

Formation de 24 par traitement de 22 avec du tribromure de phosphore et de l'acétate de potassium

A 1 cm3 de benzène, contenant 4 gouttes de PBr_3, on ajoute 340 mg de 22 , dissous dans 9 cm3 de benzène. La solution est laissée, la nuit, sous agitation magnétique, à la température ambiante.

Après addition de quelques gouttes de méthanol, la solution benzénique est lavée, avec une solution de bicarbonate de sodium, puis à l'eau. Après séchage, sur sulfate de sodium, le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu est immédiatement dissous dans 30 cm3 d'acétone, fraîchement redistillé, puis on ajoute 1 g d'acétate de potassium anhydre et le mélange est porté à reflux, pendant 5 heures.

Les sels de potassium sont filtrés et l'acétone évaporée, sous vide. Le résidu obtenu est dissous dans l'éther, lavé avec une solution de carbonate de sodium, puis à l'eau, et séché sur sulfate de sodium anhydre. Après évaporation du solvant, le produit brut est chromatographié sur alumine (ALCOA F-20), pour donner, après recristallisation du méthanol, 325 mg (86 %) de **24** :

F = 133°-134°

25 Dihydroxy-3β ,23 nor-24 choladiène-5,20 (22)

Un mélange de 400 mg de **24** dans 20 cm3 d'une solution méthanolique d'hydroxyde de potassium est mis à reflux, 30 minutes.

Après extraction de la manière habituelle, on obtient 300 mg de **25** . Une recristallisation du benzène permet d'obtenir **25** :

F = 197°-198°

α_D : -51 (C=0,9)

I.R : ν(OH) à 3 400 et 1 650 cm^{-1} ; ν(C=C) à 800 cm^{-1}

RMN : s à 0,58 (CH_3-18) ; s à 1,00 (CH_3-19) ; s à 1,70 (CH_3-21) ; d (J=7Hz) à 4,17 (2H-23)

Analyse : $C_{23}H_{36}O_2$		C	H
	calc. %	80,18	10,53
	tr %	80,12	10,30

28 Hydroxy-3β nor-24 choladiène-5,20 (22) al-23

Une solution de 240 mg de 3β ,23-diol **25** et de 300 mg de D.D.Q., dans 12 cm3 de dioxanne est abandonnée, à l'obscurité, à la température ambiante, pendant 36 heures.

Le précipité est filtré sur verre frité, lavé avec du dioxanne. Le filtrat est concentré, sous vide, pour donner un résidu jaune huileux.

Par élution avec l'acétate d'éthyle (5 %), dans le benzène sur colonne d'alumine neutre (Woelm Grade III), on obtient 120 mg (50 %) de l'aldéhyde-23 **28** . Une recristallisation du mélange chlorure de méthylène-hexane, donne **28** pur :

F = 187°-188°

α_D : -45° (C=0,2)

U.V : λ_{max} : 247 nm (ϵ = 12 600)

I.R : ν(hydroxyle) à 3 450 cm^{-1} ; ν(aldéhyde conjuguée) à 1 640 cm^{-1}

RMN : s à 0,63 (CH_3-18) ; s à 1,02 (CH_3-19) ; s à 2,20 (CH_3-21) ; m à 5,4 (H-6) ; d (J=8Hz) à 6,0 (H-22) ; d (J=8Hz) à 10,1 (H-23)

Analyse : $C_{23}H_{34}O_2$: calc. % C 80,65 H 10,01

tr % 80,52 9,96

29 Acétoxy-3β nor-24 choladiène-5,20 (22) al-23

Une solution formée de 1 g de **28** dans 10 cm3 de pyridine et de 1,2 cm3 d'anhydride acétique est agitée, à 25°, pendant 20 heures.

Après l'extraction habituelle et recristallisation de l'acétone, on obtient 981 mg (87 %) de produit pur :

F : 140°-141°

Analyse : $C_{25}H_{36}O_3$: calc. % C 78,08 H 9,44

tr % 77,98 9,56

30 Dihydroxy-3β ,23ξcholestadiène-5,20 (22) à partir de 28

Dans un tricol, sous courant d'azote, contenant 3,6 g de magnésium en tournure, on ajoute 20,5 g de bromo-1 méthyl-2 propane, dans 100 cm3 d'éther anhydre.

A ce magnésien ainsi formé, on ajoute 5,8 g d'acétoxy-3β nor-24 choladiène-5,20 (22) al-23 **28** dissous dans 100 cm3 de THF. On porte à reflux, pendant la nuit.

La solution est hydrolysée avec une solution saturée de chlorure d'ammonium. Après extraction de la manière habituelle, le produit est élué sur colonne d'alumine (ALCOA), avec une solution de 2 % de méthanol, dans le chlorure de méthylène.

Le produit **30** obtenu est cristallisé du mélange chlorure de méthylène-hexane :

F = 140°-141°

RMN : s à 0,57 (CH_3-18) ; s à 1,00 (CH_3-19) ; s à 1,72 (CH_3-21) ; d (J=6Hz) à 0,92 (CH_3-26,27) ; m à 4,4 (H-23) ; m à 5,3 (H-6 + H-22)

Analyse : $C_{27}H_{44}O_2$: calc. % C 80,94 H 11,07

tr % 80,80 10,92

31a Hydroxy-3 β cholestadiène-5,20 (22) one-23

Une solution de 2,7 g de **30** et de 3 g de D.D.Q., dans 60 cm3 de dioxanne anhydre est abandonnée, à l'obscurité, à la température ambiante, pendant 36 heures.

Après filtration et lavage des cristaux, le filtrat est concentré sous vide, pour donner un résidu jaune huileux.

Par C.P.P., on obtient 1,4 g de **31a** ; par recristallisation du cyclohexane :

F = 122°-123°

I.R : ν(C=0 conjuguée) à 1 595 et 1 660 cm^{-1}

RMN : s à 0,60 (CH_3-18) ; s à 1,01 (CH_3-19) ; s à 2,15 (CH_3-21) ; d (J=6Hz) à 0,93 (CH_3-26,27) ; m à 5,4 (H-6) ; m à 6,1 (H-22)

Analyse : $C_{27}H_{42}O_2$: calc. % C 81,35 H 10,62

tr % 81,42 10,85

32 Tétrahydropyrannyloxy-3 β méthyl-23ξ cholestadiène-5,20 (22) ol-23ξ

A une solution à 0°, de 600 mg de CuI, dans 20 cm3 d'éther anhydre, sous atmosphère d'azote, on ajoute à l'aide d'une seringue, 4 mM, d'une solution éthérée de $LiCH_3$ (1,7M).

La solution colorée ainsi obtenue, contenant le réactif $LiCu(CH_3)_2$, est agitée à 0°, pendant 5 minutes, puis on ajoute goutte à goutte, un mélange de 1 mM de l'énone **31b**, dans 6 cm3 de THF anhydre, sur une période d'une demi-heure.

La réaction est agitée à 0°, pendant deux heures, puis précipitée sur 100 cm3 d'une solution 1 N d'acide chlorhydrique refroidie.

Le mélange est extrait à l'éther, lavé à l'eau, séché sur sulfate de sodium et évaporé.

Après purification sur C.C.M., on obtient 640 mg de **32** pur :

RMN : s à 0,59 (CH_3-18) ; s à 1,01 (CH_3-19) ; d (J=1Hz) à 1,85 (CH_3-21) ; s à 1,34 (CH_3-23) ; d (J=6Hz) à 0,96 (CH_3-26,27) ; m à 5,4 (H-22 + H-6)

S.M : 480 = M-18 (6 %) ; 441 = M-C_4H_9 (14 %) ; 396 = M-THPOH (29 %) ; 378 = M-THPOH-18 (35 %) ; 339 (44 %) ; 255 (65 %) ; 85 (100 %)

Méthyl-20 cholestérol par C-méthylation du méthoxy-6β cyclo-3α,5α bisnor-23,24 cholanal-22

36 Méthoxy-6β méthyl-20 cyclo-3α , 5α bisnor-23,24 cholanal-22

Une solution de 1,4 g de t-butoxyde de potassium dans 30 cm3 de t-butanol est ajoutée à une solution de 2 g de l'aldéhyde **34** , dans 20 cm3 de t-butanol. Après l'addition de 3,5 cm3 (10 équivalents) d'iodure de méthyle, la solution est agitée à 25°, pendant 18 heures.

La solution est versée sur la glace et le produit est isolé par extraction à l'éther.

Par élution avec le mélange, hexane-éther (98 : 2), sur colonne de florisil, on obtient 1,1 g (55 %) de produit alcoylé **36** non cristallisable :

I.R : ν(-CHO) à 1 705 cm^{-1} ; ν(-OMe) à 1 090 cm^{-1}

RMN : s à 0,75 (CH_3-18) ; s à 1,03 (CH_3-19) ; 2 s à 1,12 (2 CH_3) ; s à 3,33 (-OCH_3) ; s à 9,67 (-CHO)

Analyse : $C_{24}H_{38}O_2$: calc. % C 80,39 H 10,68

tr % 80,67 10,89

35 Essai de C-alkylation de l'aldéhyde 34 avec le bromure d'isohexyle : formation de l'éther 35

Une solution de 800 mg de t-butoxyde de potassium dans 20 cm3 de t-butanol est ajoutée à une solution de 1 g de l'aldéhyde **34** dans 20 cm3 de t-butanol. Après l'addition de 4 cm3 (10 équivalents) de bromo-1 méthyl-4 pentane (bromure d'isohexyle), la solution est agitée à 25°, pendant 18 heures.

Une partie aliquote de cette solution est extraite comme précédemment. On constate seulement la présence de produit de départ. La solution est portée à reflux, pendant 3 heures.

Après extraction, de la manière habituelle et purification par C.P.P., on obtient 260 mg de l'éther d'énol **35** pur :

I.R : ν(C=C) à 1 660 cm^{-1}

RMN : s à 0,62 (CH_3-18) ; s à 1,02 (CH_3-19) ; s à 1,63 (CH_3-21) ; d à 0,88 (CH_3-26,27) ; s à 3,34 ($-OCH_3$) ; m à 2,78 (H-6α) ; t (J=6Hz) à 3,66 ($-OCH_2-$) ; m à 5,83 (H-22)

Analyse : $C_{29}H_{48}O_2$: calc. % C 81,25 H 11,29

tr % 81,06 11,30

37 Méthoxy-6β méthyl-20 cyclo-3α, 5α cholestène-22

Une suspension de 900 mg d'hydrure de sodium dans 15 cm3 de DMSO est chauffée, avec agitation, sous atmosphère d'azote à 70°-75°. Le dégagement d'hydrogène ayant cessé environ 1 heure après, on refroidit.

On ajoute alors rapidement une solution de 15,5 g d'iodure d'isoamyl-triphénylphosphonium dans 50 cm3 de DMSO. A cette solution de couleur

rouge, on ajoute rapidement 5,4 g de l'aldéhyde **36** dissous dans 75 cm3 de DMSO. Le mélange est alors porté à 60°, pendant 3 heures, sous atmosphère d'azote.

Après extraction, de la manière habituelle, et purification sur colonne d'alumine, on obtient par élution à l'hexane 3,6 g (60 %) d'oléfine **37** :

I.R : ν(-OMe) à 1 010 cm^{-1}

RMN : s à 0,79 (CH_3-18) ; s à 1,02 (CH_3-19) ; d (J=6Hz) à 0,91 (CH_3-26,27) ; 2 s à 1,12 et 1,14 (CH_3-21 + CH_3-21') ; d de t (J_{22-23}=12Hz et J_{22-24}=1Hz) à 5,45 (H-22) ; d de t (J_{23-22}=12Hz et J_{23-24}=6Hz) à 5,13 (H-23)

Analyse : $C_{29}H_{48}O$: calc. % C 84,40 H 11,72

tr % 84,31 11,72

38 Méthoxy-6β méthyl-20 cyclo-3α , 5α cholestane

Une solution de 3,5 g de **37** dans 200 cm3 d'éthanol à 95 % est hydrogénée, en présence de 350 mg de charbon palladié à 10 %, à la température ordinaire et sous pression, pendant 18 heures.

On obtient 3,42 g (97 %) de produit huileux monotache sur C.C.M. :

I.R : ν(-OCH_3) à 960 et 1 010 cm^{-1}

RMN : s à 0,77 (CH_3-18) ; s à 1,01 (CH_3-19) ; d (J=6Hz) à 0,85 (CH_3-26,27) ; s à 0,92 (CH_3-21) ; s à 0,86 (CH_3-21')

Analyse : $C_{29}H_{50}O$: calc. % C 83,99 H 12,15

tr % 84,27 12,23

39 Méthyl-20 cholestérol

La solution de 3,4 g de l'éther **38** dans 90 cm3 de dioxanne est portée à 80°, puis on ajoute 160 mg d'acide p-toluène sulfonique et 32 cm3 d'eau. Le mélange est maintenu à 80°, pendant 6 heures.

Après refroidissement à 0° le produit cristallise de la solution.

Une recristallisation du méthanol donne 2,6 g (81 %) de méthyl-20 cholestérol :

F = 123°-124°

I.R : ν(OH) à 3 400 cm^{-1}

RMN : s à 0,75 (CH_3-18) ; s à 0,98 (CH_3-19) ; d (J=6Hz) à 0,85 (CH_3-26,27) ; s à 0,92 (CH_3-21) ; s à 0,85 (CH_3-21')

Méthyl-20 cholestérol par C-méthylation avec énolisation régio-spécifique du tétrahydropyrannyloxy-(20R) céto-22 cholestérol

40 (20R) et (20S) acétoxy-3β hydroxy 20 prégnène-5 carbonitrile-20

Dans un récipient contenant 230 cm3 d'acétone cyanohydrine, on ajoute, progressivement, 50 g d'acétate de prégnénolone, puis 5 g de KCN.

Le mélange est agité pendant deux heures, à la température ambiante.

Les cristaux formés sont alors filtrés et lavés successivement, avec une solution aqueuse à 2 % d'acide acétique, puis par une solution à 95 % d'éthanol.

On obtient finalement 40 g d'acétoxy-3β hydroxy-20 prégnène-5 carbonitrile-20 **40** .

(20R) et (20S) acétoxy-3 β tétrahydropyrannyloxy-20 prégnène-5 carbonitrile-20

Le mélange d'épimères en 20 (40 g) est mis en suspension dans 90 cm3 de dihydropyranne, puis, après refroidissement, à 0°, on ajoute 1 cm3 de $POCl_3$. La solution est abandonnée une nuit.

Les cristaux sont alors filtrés, puis lavés abondamment à l'hexane.

Les épimères (20R) **42** et (20S) **41** ont été séparés dans le rapport 10 : 1.

Trois recristallisations successives du mélange benzène-hexane donnent :

42 - le (20R) acétoxy-3 β tétrahydropyrannyloxy-20 prégnène-5 carbonitrile-20

F = 206°-207°

I.R : ν(C=O) à 1 730 cm^{-1}

RMN : 2 s à 1,01 (CH_3-18 + CH_3-19) ; s à 1,63 (CH_3-21)

Les eaux-mères, contenant le mélange des épimères (20R) et (20S), dans le rapport 1 : 1, sont évaporées sous vide. Le résidu est alors dissous dans l'acétone.

Après plusieurs recristallisations successives dans ce solvant, on obtient :

41 - le (20S) acétoxy-3 β tétrahydropyrannyloxy-20 prégnène-5 carbonitrile-20

RMN : s à 0,95 (CH_3-18) ; s à 1,02 (CH_3-19) ; s à 1,63 (CH_3-21)

43 Hydroxy-3 β tétrahydropyrannyloxy-(20R) cholestène-5 imino-22

Une solution de 26 g de **42** , dans 1 500 cm3 de benzène anhydre, est ajoutée sur une période d'une demi-heure, à un magnésien préparé avec 80 g de bromure d'isopentyle, et 13 g de magnésium, dans 700 cm3 d'éther anhydre.

La solution est portée à reflux pendant 10 heures.

Après refroidissement de cette solution, on ajoute une solution saturée de chlorure d'ammonium.

Après l'extraction avec l'acétate d'éthyle, selon la méthode habituelle, le résidu cristallisé obtenu est recristallisé du mélange hexane-chlorure de méthylène, pour donner l'imine **43** :

F = 136°-137°

I.R : ν(C=N-H) à 1 630 cm^{-1}

RMN : s à 0,84 (CH_3-18) ; s à 1,01 (CH_3-19) ; d (J=6Hz) à 0,92 (CH_3-26,27)

44 Hydroxy-3 β tétrahydropyrannyloxy-(20R) cholestène-5 one-22

L'imine **43**(20 g) est dissoute dans 100 cm3 de benzène et 10 cm3 d'acide acétique glacial.

La solution est chauffée à 100°, pendant une heure.

Le résidu obtenu, après extraction, est chromatographié sur colonne de silice, avec le chlorure de méthylène comme éluant.

Le produit **44** est recristallisé du méthanol :

F = 174°-175°

RMN : s à 0,75 (CH_3-18) ; s à 0,99 (CH_3-19) ; s à 1,43 (CH_3-21) ; d (J=6Hz) à 0,86 (CH_3-26,27)

S.M : 401 = M-COC_5H_{11} ; 399 = M-OTHP ; 317 = M-OTHP - COC_5H_{11}

45 Hydroxy-3 β méthyl-20 cholestène-5 one-22

Approximativement 250 cm3 d'ammoniac liquide anhydre sont introduits dans un tricol de 500 cm3, muni d'un agitateur magnétique. On ajoute peu à peu, 320 mg de calcium.

Après dissolution du métal, la solution de 2,0 g de tétrahydropyrannyloxy-(20R) ceto-22 cholestérol **44** dans 30 cm3 de THF anhydre, est additionnée, sur une période d'une demi-heure.

Après la décoloration de la solution bleue, on ajoute 50 cm3 de THF anhydre et l'ammoniac est évaporé. On ajoute alors 5 cm3 d'iodure de méthyle, dans 10 cm3 de THF et la solution est alors abandonnée, la nuit, sous agitation magnétique.

On ajoute une solution saturée de chlorure d'ammonium, et le mélange est extrait à l'éther. La solution éthérée est lavée, séchée et le solvant évaporé. Le résidu huileux est chromatographié sur colonne de silice, et, par élution avec 5 % d'acétate d'éthyle dans le benzène, on obtient 350 mg de produit alcoylé pur **45** .

Une recristallisation du méthanol fournit un échantillon analytique :

F = 117°-118°

I.R : ν(hydroxyl) à 3 330 cm^{-1} ; ν(C=O) à 1 680 cm^{-1}

S.M : 315 = M-$C_6H_{11}O$ (68 %) ; 297 = M-$C_6H_{11}O$-H_2O (100 %) ; 271 (23 %)

49 Acétoxy-3 β méthyl-20 cholestène-5 one-22

L'acétylation de l'alcool **45** avec le mélange pyridine-acide acétique (18 h à 22°) donne, après recristallisation du méthanol, un échantillon analytique :

F = 119°-120°

I.R : ν(OAc) à 1 240 et 1 725 cm^{-1} ; ν(C=O) à 1 680 cm^{-1}

RMN : s à 0,72 (CH_3-18) ; s à 1,00 (CH_3-19) ; d (J=6Hz) à 0,90 (CH_3-26,27) ; s à 1,17 (CH_3-21) ; s à 1,13 (CH_3-28) ; s à 2,04 (CH_3CO-)

S.M : 396 = M-AcOH (34 %) ; 297 = M-AcOH-$C_6H_{11}O$ (100 %)

Analyse : $C_{30}H_{48}O_3$: calc. % C 78,89 H 10,59

tr % 79,00 10,46

50 Tétrapyrannyloxy-3 β méthyl-20 cholestène-5 one-22

A une solution de 300 mg de l'alcool **45** dans 2 cm3 de dihydropyranne, on ajoute une goutte d'oxychlorure de phosphore (18 h à 25°).

La solution est versée sur une solution refroidie de CO_3HNa, et extraite au chlorure de méthylène. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium, puis évaporée sous pression réduite.

Après purification par C.P.P. on obtient 290 mg de **50** qui, recristallisé du méthanol, donne :

F = 104°-105°

RMN : s à 0,71 (CH_3-18) ; s à 0,98 (CH_3-19) ; s à 1,16 (CH_3-21) ; s à 1,12 (CH_3-21') ; d (J=6Hz) à 0,89 (CH_3-26,27)

S.M : 396 = M-THPOH (56 %) ; 297 = M-THPOH-$C_6H_{11}O$ (57 %) ; 85 (100 %)

51 Tétrapyrannyloxy-3β méthyl-20 cholestène-5 ol-22

A une solution de 200 mg de cétone **50** dans le THF, on ajoute 100 mg de $AlLiH_4$ et le mélange est porté à reflux, pendant 18 heures.

On obtient, après extraction de la manière habituelle et purification par C.P.P., 120 mg de **51** . Par recristallisation de l'hexane :

F = 139°-140°

I.R : ν(OH) à 3 500 cm^{-1}

RMN : s à 0,78 (CH_3-18) ; s à 1,00 (CH_3-19) ; d (J=6Hz) à 0,89 (CH_3-26,27) ; s à 0,97 (CH_3-21) ; s à 0,87 (CH_3-21')

S.M : 398 = M-THPOH (16 %) ; 297 = M-THPOH-$C_6H_{13}O$ (12 %) ; 85 (100 %)

Analyse : $C_{33}H_{56}O_3$: calc. % C 79,14 H 11,27

tr % 78,82 11,17

53 Tétrapyrannyloxy-3β méthyl-20 cholestène-5

A une solution de 100 mg de l'alcool **51** dans 1 cm3 de pyridine, on ajoute 2 gouttes de chlorure de mésyle et la solution est abandonnée à 23°, pendant 18 heures.

Après addition d'eau, le produit est extrait avec du chlorure de méthylène. Le résidu (105 mg) est séché, puis ajouté à une solution de 50 mg de $LiAlH_4$ dans 5 cm3 de THF. Cette solution est chauffée à reflux pendant la nuit.

L'extraction habituelle donne, après recristallisation du méthanol, 43 mg de **53** :

F = 100°-101°

RMN : s à 0,75 (CH_3-18) ; s à 0,99 (CH_3-19) ; d (J=6Hz) à 0,85 (CH_3-26,27) ; s à 0,92 (CH_3-21) ; s à 0,85 (CH_3-21')

Analyse : $C_{33}H_{56}O_2$: calc. % C 81,75 H 11,64

tr % 81,52 11,57

39 Méthyl-20 cholestérol

La solution de 50 mg de l'éther **53** dans 2 cm3 d'éthanol contenant 2,5 mg d'acide p-toluenesulfonique est portée à reflux, pendant 1 heure.

Après refroidissement, la solution est diluée avec de l'eau et le produit extrait au chlorure de méthylène. Après évaporation du solvant, le résidu est recristallisé deux fois du méthanol, pour donner 35 mg de **39** :

F = 122° - 123°

I.R : ν(-OH) à 3 400 cm^{-1}

RMN : s à 0,75 (CH_3-18) ; s à 0,98 (CH_3-19) ; d (J=6Hz) à 0,85 (CH_3-26,27) ; s à 0,92 (CH_3-21) ; s à 0,85 (CH_3-21')

S.M : 400 = M (83 %) ; 385 = M-CH_3 (6 %) ; 382 = M-H_2O (10 %) ; 367 = M-H_2O-CH_3 (9 %) ; 315 = M-C_6H_{13} (17 %) ; 297 = M-C_6H_{13}-H_2O (13 %) ; 57 (100 %)

Analyse : $C_{28}H_{48}O$: calc. % C 83,93 H 12,08

tr % 83,70 12,06

46 Ethyl-20 céto-22 cholestérol

L'alkylation du tétrapyrannyloxy-(20R) céto-22 cholestérol **44** avec le bromure d'éthyle, est faite dans les mêmes conditions que pour le méthyl-20 **45** .

Ainsi 1 g de produit de départ donne 181 mg de **46** pur, après deux recristallisations du méthanol :

F = 114°-115°

I.R : ν(-OH) à 3 300 cm^{-1} ; ν(C=O) à 1 680 cm^{-1}

RMN : s à 0,71 (CH_3-18) ; s à 0,98 (CH_3-19) ; d (J=6Hz) à 0,89 (CH_3-26,27) ; s à 1,12 (CH_3-21')

S.M : 329 = M-$C_6H_{11}O$ (67 %) ; 311 = M-$C_6H_{11}O$-H_2O (100 %) ; 271 (15 %)

Tests biologiques

Des rats Wistar mâles (165 g) sont maintenus, pendant 7 jours, dans un régime semi-synthétique, composé de :

70 % de céréales mélangées,
22 % de poudre de lait écrémé,
7 % de germe de blé,
1 % d'un mélange de vitamines.

Celui-ci est facilement supporté par les rats[49]. L'amino-22 cholestérol est additionné aux céréales.

Les animaux sont ensuite tués par décapitation.

Le sérum est dosé pour le cholestérol total, par la méthode de Pearson[50]. Le foie est partagé en quatre parties aliquotes qui sont utilisées pour l'étude de l'oxydation et de l'hydroxylation du cholestérol, et pour l'expérience de biosynthèse. La quatrième partie aliquote est dissoute dans une solution KOH alcoolique, à 15 %, la partie non saponifiable est extraite à l'éther de pétrole et le résidu, analysé pour le cholestérol total .

I ETUDE DE L'OXYDATION

A/ Préparation des suspensions mitochondriales[48-51]

Les foies sont homogénéisés dans une solution contenant 10 % (en poids par volume), de saccharose.

L'homogénat est centrifugé à 600 x g, pendant 10 minutes, pour enlever les noyaux, les cellules non brisées et les débris cellulaires.

Le surnageant est alors centrifugé, pendant 12 minutes, à 8 500 x g, pour séparer les mitochondries. Le surnageant de cette deuxième centrifugation est utilisé pour préparer le cofacteur soluble, après ébullition et filtration.

Les mitochondries sont remises en suspension dans la solution de saccharose, à 10 %, et recentrifugées, pour éliminer les microsomes restants.

B/ Incubations

Les incubations sont effectuées dans des flacons "Erlenmeyer", bouchés, de 125 cm3, contenant un puits central.

Le mélange d'incubation consiste en :

- 1 cm3 de préparation mitochondriale (11,1 mg de protéine),

- 1 cm3 d'une solution contenant :

  . 25 mg d'adénosine triphosphate (ATP)
  . 5 mg de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD)
  . 8 mg d'adénosine monophosphate (AMP)
  . 15 mg de glutathion réduit

. 30 mg de citrate de sodium monohydraté
. 10 mg de nitrate de magnésium hexahydraté
. 2 000 unités de pénicilline G de potassium
. 1 mg de sulfate de streptomycine

- 5 cm3 de substrat marqué (26-C^{14}cholestérol) dans 0,25 M_{tris} (hydroxyméthyl) amino méthane HCl, pH 8,5

- 5 cm3 de surnageant bouilli (cofacteur soluble)

Les incubations sont faites à 37°, pendant 18 heures.

A la fin de cette période, 2,5 cm3 d'une solution méthanolique 1M d'Hyamine, sont injectés dans le puits central. La solution est acidifiée avec 2,5 cm3 d'une solution normale d'H_2SO_4 et les flacons sont agités pendant 3 heures, à 37°, pour déplacer $^{14}CO_2$.

La solution d'Hyamine est enlevée du puits central et un échantillon est pris pour le dosage radioactif par spectrométrie de scintillation liquide.

II ETUDE DE L'HYDROXYLATION

A/ Préparation des suspensions microsomales[52]

Les suspensions microsomales sont préparées par la méthode de Shefer, Hauser et Mosbach[52].

L'homogénéisation des morceaux de foie s'effectue dans 6 cm3 d'une solution contenant :

. 0,167 M de solution tampon phosphate pH 7,4
. 0,075 M de nicotinamide
. 0,25 M de saccharose
. 2,5 mM de EDTA neutralisé.

Les débris cellulaires et les noyaux sont séparés par centrifugation à 500 x g, pendant 5 minutes. La solution surnageante est centrifugée à 10 000 x g, pendant 10 minutes, pour sédimenter la fraction mitochondriale.

Les microsomes sont obtenus par centrifugation à 100 000 x g, pendant 60 minutes du surnageant de la fraction mitochondriale.

Les microsomes sont alors remis en suspension dans la solution refroidie, et sont sédimentés à nouveau, à 100 000 x g.

B/ Incubations

Les incubations sont effectuées dans des flacons Erlenmeyer, de 25 cm3.

Le mélange d'incubation est préparé de la manière suivante :

- (1,2-^{3}H) cholestérol (0,5 μ M ; 8,25 x 10^{5} cpm/μ M), dissous avec 6,7 mg de Tween 20 dans le minimum de méthanol ; après évaporation du méthanol, sous courant d'azote à 40°-50°C, on dissout le résidu dans une solution tampon (pH 7,4) de phosphate de potassium (0,167 mM),

- 11 μ M de $MgCl_2$

- 3,0 μ M de $NADP^+$

- 6,0 μ M de glucose-6-phosphatase,

- 1 U.I glucose-6-phosphatase déshydrogénase,

- 1 cm3 de suspension microsomale (0,9 mg de protéine).

Le volume final représente 2,3 cm3.

L'incubation est faite à 37°C, avec agitation. La réaction est arrêtée par addition de 7,5 cm3 de chlorure de méthylène-éthanol (5 : 1), à une fraction aliquote de 0,5 cm3 du mélange réactionnel.

Les stéroïdes sont séparés par plaques préparatives de silicagel avec l'hexane-acétate d'éthyle (8 : 2) comme éluant. Les bandes sont révélées par vapeur d'iode et après extraction, la radioactivité est mesurée par scintillation liquide.

III ETUDE DE LA BIOSYNTHESE DES LIPIDES

Des tranches de foie (500 mg), sont incubées à 37°C, pendant 3 heures, dans 5 cm3 de tampon phosphate (pH 7), contenant :

- 0,6 mM $MgCl_2$
- 0,03 M de nicotinamide
- 0,5 μ Ci (1-^{14}C) acétate.

La réaction est arrêtée par l'addition d'une solution méthanolique de KOH à 15 %.

Le cholestérol est extrait du mélange saponifié et isolé comme digitonide [53].

Le résidu aqueux est acidifié à pH 1, et les acides gras sont extraits à l'éther. Le digitonide-cholestérol est dissous dans le méthanol et dosé par scintillation liquide. Les acides gras sont comptés directement.

CONCLUSION

Le rôle important du cholestérol justifie la recherche de composés pouvant interférer sur le cours de son métabolisme.

La présente étude est basée sur la constatation que la coupure enzymatique de la liaison 20-22 du cholestérol, laissait entrevoir la possibilité d'inhiber la formation de prégnénolone, par adjonction de fonctions en C-20 et C-22.

Le travail effectué a permis la synthèse de quatre composés nouveaux :

- l'amino-(22R) cholestérol,
- l'amino-(22S) cholestérol,
- l'oxymo-22 cholestérol,
- le méthyl-20 cholestérol.

Sur le plan chimique, il apparaît que, si la fonction céto-22 est très encombrée, elle peut toutefois, malgré l'affirmation contraire de nombreux auteurs, réagir avec des réactifs comme le chlorhydrate d'hydroxylamine et l'hydrazine.

Les amino-22 cholestérol sont obtenus de façon stéréospécifique, avec inversion de configuration des tosyloxy-22 cholestérol par l'ion N_3^- en solvant polaire aprotique ; les azides étant réduits en amines par $LiAlH_4$.

En effet, la réduction non stéréospécifique de l'oxime-22 cholestérol, conduit au mélange des deux amines, difficilement séparables.

Dans la synthèse du méthyl-20 cholestérol, les meilleurs rendements sont obtenus en réalisant la C-méthylation, au niveau de l'intermédiaire du méthoxy-6 β cyclo-3α, 5α bisnor-23, 24 cholanal-22. Cette méthylation n'est cependant pas stéréospécifique et nous avons montré que, s'il était nécessaire pour les tests biologiques, d'obtenir un composé marqué en 21, de façon stéréospécifique, il est possible de réaliser cette méthylation au niveau du tétrahydropyrannyloxy-20R céto-22 cholestérol.

Sur le plan biologique, nous avons pu tester ces quatre composés in vitro et in vivo et obtenir des premiers résultats concernant les trois composés azotés en 22. Les résultats des essais sur le quatrième composé (méthyl-20 cholestérol) ne seront connus qu'ultérieurement.

Les essais in vitro portaient d'une part, sur la biosynthèse du cholestérol à partir de précurseurs marqués, et d'autre part, sur sa dégradation en prégnénolone dans le cortex des surrénales.

Dans la biosynthèse du cholestérol, la localisation de l'inhibition est située pour les deux amines, après la formation du desmostérol, et pour l'oximo-22 cholestérol, après la formation de squalène, ce qui, en première analyse semble peu favorable, sur le plan des perspectives thérapeutiques.

Dans la biodégradation par contre, l'effet inhibiteur a été très marqué pour les trois produits, surtout pour l'amino-22R cholestérol. Cette action plus intense que celle des autres produits, jusqu'ici connus, a justifié la réalisation de tests in vivo, actuellement en cours, pour déterminer l'action de ce produit sur le métabolisme des hormones stéroïdiques.

Les essais in vivo n'ont porté que sur l'amino-22R cholestérol, puisque les résultats in vitro le classaient comme le produit le plus prometteur.

Réalisées avec des rats Wistar, ces études ont porté, d'une part, sur la biosynthèse du cholestérol et des acides gras, d'autre part, sur la dégradation en acides biliaires.

Les résultats les plus notables sont :

- réduction de 76 % de la biosynthèse des acides gras ;

- réduction de 43 % de l'hydroxylation en 7α du cholestérol ;

- augmentation de 30 % de l'oxydation en C-26 du cholestérol ;

- réduction de 27 % de la biosynthèse du cholestérol.

De tout ceci il résulte que, trois des produits synthétisés (et éventuellement le quatrième, lorsque les résultats définitifs seront connus), répondent bien au but recherché, c'est-à-dire qu'ils exercent une action d'inhibition, à des niveaux divers, dans le métabolisme du cholestérol.

Ils laissent en outre, espérer que des synthèses d'autres fonctions en C-20 et C-22, aboutiront à des produits susceptibles d'intéresser la thérapeutique.

BIBLIOGRAPHIE

1 H. DANIELSSON et K. EINARSSON, Acta Chem. Scand., 18, 831 (1964)
D. MENDELSOHN, L. MENDELSOHN et E. STAPLE, Biochim. Biophys. Acta, 97, 379 (1965)

H. DANIELSSON et K. EINARSSON, J. Biol. Chem., 241, 1449 (1966)

2 P. NAIR et D. KRITCHEVSKY, The Bile Acids PlenumPress, Vol. 2, Chap. I (1973)

3 R.I. DORFMAN et F. UNGAR, Metabolism of Steroïd Hormones, Academic Press (1965)

R.I. DORFMAN, K. YAMASAKI et M. DORFMAN, Biogenesis and Action of Steroïd Hormones, Geron-X (1969)

G. PINCUS, T. NAKAO et J.F. TAIT, Steroïd Dynamics, Academic Press (1966)

4 K. SHIMIZU, M. GUT et R.I. DORFMAN, J. Biol. Chem., 237, 699 (1962)

5 S. BURSTEIN et M. GUT, Recent Progress in Hormone Research, Academic Press, 27, 303 (1971)

6 S. BURSTEIN, H. ZAMOSCIANYK, N. CO, M. ADELSON, D.S.M. PRASAD, A. GREENBERG et M. GUT, Biochim. Biophys. Acta, 231, 223 (1971)

7 K.M.J. MENON, M. DROSDOVSKY, R.I. DORFMAN et E. FORCHIELLI, Steroïds, Suppl. 1, 95 (1965)

8 G. CONSTANTOPOULOS, P.S. SATOH et T.T. TCHEN, Biochem. Biophys. Res. Commun., 8, 50 (1962)

9 S. BURSTEIN, H. ZAMOSCIANYK, H. KIMBALL, N.K. CHAUDHURI et M. GUT, Steroïds, 15, 13 (1970)

10 S.B. KORITZ et P.F. HALL, Biochemistry, 3, 1298 (1964)

11 P.F. HALL et S.B. KORITZ, Biochim. Biophys. Acta, 93, 441 (1964)

12 E.R. SIMPSON et G.S. BOYD, European J. Biochem, 2, 275 (1967)

13 S. BURSTEIN, H.L. KIMBALL et M. GUT, Steroïds, 15, 809 (1970)

14 J.E. VAN LIER et LL. SMITH, J. Org. Chem, 35, 2627 (1970)

J.E. VAN LIER et L.L. SMITH, Biochim. Biophys. Acta, 210, 153 (1970)

J.E. VAN LIER et L.L. SMITH, Biochem. Biophys. Res. Commun, 40, 510 (1970)

15 R.J. KRAAIPOEL, H.J. DEGENHART, J.G. LEFERINK, V. VAN BEEK, H. DE LEEUW-BOON et H.K.A. VISSER, F.E.B.S. Letters 50, 204 (1975)

16 S.L. LIEBERMAN, L. BANDY, V. LIPPMAN et K.D. ROBERTS, Biochem. Biophys. Res. Commun, 34, 367 (1969)

B. LUTTRELL, R.B. HOCHBERG, W.R. DIXON, P.D. MC DONALD et S. LIEBERMAN, J. Biol. Chem., 247, 1462 (1972)

17 S. BURSTEIN, J. DINH, N. CO, M. GUT, H. SCHLEYER, D.Y. COOPER et O. ROSENTHAL, Biochemistry, 11, 2883 (1972)

18 Q. KHUONG-HUU, Y. LETOURNEUX, M. GUT et R. GOUTAREL, J. Org. Chem., 39, 1066 (1974)

19 E.P. BURROWS, G.H. HORNBY et E. CASPI, J. Org. Chem., 34, 103 (1969)

20 D.H.R. BARTON, J.P. POYSER et P.G. SAMMES, J. Chem. Soc. A, 53 (1972)

21 K. TSUDA et HAYATSU, J. Amer. Chem. Soc., 81, 5987 (1959)

22 W. COLE et P.L. JULIAN, J. Amer. Chem. Soc., 67, 1369 (1945)

23 F.S. PROUT et Z.F. CHMIELEWICZ, J. Org. Chem., 24, 308 (1959)

24 Y. LETOURNEUX, Q. KHUONG-HUU, M. GUT et G. LUKACS, J. Org. Chem., 40, 1674 (1975)

25 T.A. WITTSTRUCK, J. Org. Chem., 38, 1426 (1973)

26 H.J. REICH, M. JAUTELAT, M.T. MESSE, F.J. WEIGERT et J.D. ROBERTS, J. Amer. Chem. Soc., 91, 7445 (1969)

H. EGGERT et C. DJERASSI, J. Org. Chem., 38, 3788 (1973)

27 J.B. STOTHERS, Carbon-13 NMR Spectroscopy, Academic Press, N.Y. (1972)

28 G. LUKACS et C.R. BENNETT, Bull. Soc. Chim. France, 3996 (1972)

29 Y. LETOURNEUX, M.M.L. LO, N. CHAUDHURI et M. GUT, J. Org. Chem., 40, 516 (1975)

30 N.K. CHAUDHURI, J.A. WILLIAMS, R. NICKOLSON et M. GUT, J. Org. Chem., 34, 3759 (1969)

31 H. LINDLAR, Helv. Chim. Acta, 35, 446 (1952)

32 N.K. CHAUDHURI et M. GUT, J. Amer. Chem. Soc., 87, 3737 (1965)

33 F. KOHEN, R.A. MALLORY et I. SCHEER, J. Org. Chem., 36, 716 (1971)

34 D.J. FAULKNER, Synthesis, 175 (1971)

35 E. PIERS et R.J. KEZIERE, Canad. J. Chem., 47, 137 (1969)

36 R.F.N. HUTCHINS, M.J. THOMPSON et J.A. SVOBODA, Steroïds, 5, 113 (1970)

37 G.R. PETTIT, B. GREEN, G.L. DUNN et P. SUNDER-PLASSMAN, J. Org. Chem., 35, 1387 (1970)

38 R. GREENWALD, M. CHAYKOVSKY et E.J. COREY, J. Org. Chem., 28, 1128 (1963)

39 A.M. KRUBINER et E.P. OLIVETO, J. Org. Chem., 31, 24 (1966)

G. DREFAHL, K. PONSOLD et H. SCHICK, Chem. Ber., 98, 604 (1965)

S.G. WYLLIE et C. DJERASSI, J. Org. Chem. 33, 305 (1968)

40 N.K. CHAUDHURI, R. NICKOLSON, H. KIMBALL et M. GUT, Steroïds, 15, 525 (1970)

41 M.J. WEISS, R.E. SCHAUB, G.R. ALLEN, J.F. POLETTO, C. PIDACKS, R.B. CONROW et C.J. COSCIA, Tetrahedron, 20, 357 (1964)

L.E. HIGHTOWER, L.R. GLASGOW, K.M. STONE, D.A. ALBERTSON et H.A. SMITH, J. Org. Chem., 35, 1881 (1970)

42 G.A. SMITH et D.H. WILLIAMS, J. Chem. Soc. A, 2811, (1972)

43 N.S. BHACCA et D.H. WILLIAMS, Applications of NMR Spectroscopy in Organic Chemistry : Illustrations from the Steroïd Field, Holden-Day, 1964, p. 35-36

44 T.A. NARWID, K.E. COONEY et M.R. USKOKOVIC, Helv. Chim. Acta, 54, 771 (1974)

45 M.N. CAYEN et D. DVORNIK, Canad. J. Biochem., 179, 46 (1968)

46 S. BURSTEIN, H.L. KIMBALL, N.K. CHAUDHURI et M. GUT, J. Biol. Chem., 243, 4417 (1968)

47 M. GUT, Y. LETOURNEUX, J.A. STORY, S.A. TEPPER et D. KRITCHEVSKY, Experientia, 1326 (1974)

48 D. KRITCHEVSKY, R.R. KOLMAN, M.W. WHITEHOUSE, M.C. COTTRELL et E. STAPPLE, J. Lipid Res. 1, 83 (1959)

49 D. KRITCHEVSKY, M.W. WHITEHOUSE et E. STAPLE, J. Lipid Res. 1, 154 (1960)

50 S. PEARSON, S. STERN et T.H. MC GAVACK, Analyt. Chem., 25, 813 (1953)

51 M.W. WHITEHOUSE, E. STAPLE et S. GURIN, J. Biol. Chem., 234, 276 (1959)

52 S. SHEFER, S. HAUSER et E.H. MOSBACH, J. Lipid Res., 7, 763 (1966)

53 W.M. SPERRY et M. WEBB, J. Biol. Chem., 187, 97 (1950)

I.L. SHAPIRO et D. KRITCHEVSKY, Analyt. Biochem., 5, 88 (1963)

Service de Reprographie
C.N.R.S.
Gif

Service de Reprographie
C . N . R . S .
Gif